

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**TROPISMO DEL VIH-1: DISEÑO Y VALIDACIÓN DE
DIFERENTES HERRAMIENTAS GENOTÍPICAS PARA LA
DETERMINACIÓN DEL TROPISMO VIRAL EN LA
PRÁCTICA CLÍNICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Eduardo Seclén Hidalgo

Bajo la dirección de los doctores

Eva Poveda López
Vicente Soriano Vázquez

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**TROPISMO DEL VIH-1: DISEÑO Y VALIDACIÓN DE DIFERENTES
HERRAMIENTAS GENOTÍPICAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL
TROPISMO VIRAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA**

TESIS DOCTORAL

Eduardo Seclén Hidalgo

Madrid, 2012

TESIS DOCTORAL

TROPISMO DEL VIH-1: DISEÑO Y VALIDACIÓN DE DIFERENTES HERRAMIENTAS GENOTÍPICAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL TROPISMO VIRAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid por el licenciado:

Eduardo Seclén Hidalgo

Directores de Tesis:

Dra. Eva Poveda López

Doctora en Ciencias Biológicas
Laboratorio de Biología Molecular
Servicio de Enfermedades Infecciosas
Hospital Carlos III, Madrid

Dr. Vicente Soriano Vázquez

Doctor en Medicina
Servicio de Enfermedades Infecciosas
Hospital Carlos III, Madrid

Madrid, 2012

Vº Bueno directores de tesis:

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
1.1. Estructura del VIH-1	9
1.2. Ciclo replicativo del VIH-1	13
1.3. Entrada del VIH-1 en la célula	16
1.4. Inhibidores de la entrada: antagonistas de CCR5	19
1.4.1. Maraviroc	20
1.4.2. Otros antagonistas de CCR5	24
1.5. Tropismo viral: definición y bases moleculares	26
1.6. Dinámica del tropismo viral durante la progresión de la enfermedad	28
1.9. Uso clínico de los antagonistas de CCR5: determinación del tropismo viral en la práctica clínica	31
1.9.1. Métodos fenotípicos	31
1.9.2. Métodos genotípicos	34
OBJETIVOS	41
PACIENTES Y MÉTODOS	45
2.1. Población de estudio	47
2.2. Recogida de muestras de plasma	47
2.3. Recogida de células mononucleares de sangre periférica	47
2.4. Determinación de la carga viral plasmática	48
2.5. Recuento de linfocitos T CD4+	48
2.6. Extracción de ARN viral	49
2.7. Extracción de ADN	49
2.8. Análisis genético del gen <i>pol</i>	49
2.9. Amplificación de la región V3 de la envuelta viral	50
2.10. Visualización del amplicón y purificación	52
2.11. Secuenciación	53
2.12. Análisis de secuencias	54

2.13. Interpretación de la región V3: determinación genotípica del tropismo viral	54
2.14. Determinación fenotípica del tropismo viral	56
2.15. Datos epidemiológicos y marcadores biológicos	57
2.16. Análisis estadístico	58

ESTUDIO 1: Concordancia entre herramientas genotípicas y fenotípicas para la determinación del tropismo del VIH-1 **61**

3.1. Objetivo y diseño del estudio	63
3.2. Pacientes y métodos	63
3.2.1. Población de estudio	63
3.2.2. Determinación genotípica y fenotípica del tropismo viral	64
3.3. Resultados	64
3.3.1. Características basales de la población de estudio	64
3.3.2. Características de las secuencias V3	67
3.3.3. Correlación entre los resultados genotípicos en muestras de plasma	68
3.3.4. Correlación entre los resultados genotípicos en CMSP y fenotípicos en plasma	71
3.4. Discusión	73

ESTUDIO 2: Optimización de una herramienta genotípica para la determinación del tropismo viral en la práctica clínica **79**

4.1. Diseño y objetivo del estudio	81
4.2. Pacientes y métodos	81
4.2.1. Población de estudio	81
4.2.2. Determinación genotípica del tropismo viral	82
4.3. Resultados	84
4.3.1. Concordancia entre las herramientas genotípicas y Trofile®	84

4.3.2. Optimización del umbral de WebPSSM _{X4/R5} y WebPSSM _{SI/NSI} para la detección de virus X4-trópicos	85
4.3.3. Validación de WebPSSM _{X4/R5-8} y WebPSSM _{SI/NSI-6,4}	87
4.3.4. Prevalencia de virus X4-trópicos según Trofile® y las herramientas genotípicas	88
4.4. Discusión	89

***ESTUDIO 3: Dinámica del tropismo viral en pacientes VIH+ bajo
tratamiento antirretroviral efectivo: Implicaciones para la
determinación del tropismo viral en pacientes con viremia
indetectable***

95

5.1. Diseño y objetivo del estudio	97
5.2. Pacientes y métodos	98
5.2.1. Población de estudio	98
5.2.2. Determinación genotípica del tropismo viral	99
5.3. Resultados	99
5.3.1. Características basales de la población de estudio	99
5.3.2. Determinación genotípica del tropismo viral	100
5.3.3. Concordancia entre los resultados de tropismo viral obtenidos a partir de muestras basales de plasma y CMSP	101
5.3.4. Concordancia entre los resultados de tropismo viral obtenidos a partir de muestras de plasma basales y CMSP al final del seguimiento	103
5.3.5. Concordancia entre los resultados de tropismo viral obtenidos a partir de muestras de CMSP basales y del final del seguimiento	105
5.4. Discusión	107

<i>ESTUDIO 4: Validación de herramientas genotípicas para la determinación del tropismo del VIH-1 en la práctica clínica</i>	113
6.1. Diseño y objetivo del estudio	115
6.2. Pacientes y métodos	115
6.2.1. Población de estudio	115
6.2.2. Determinación genotípica del tropismo viral	116
6.3. Resultados	117
6.3.1. Características basales de la población de estudio	117
6.3.2. Pacientes que inician maraviroc con viremia basal detectable	119
6.3.2.1. Respuesta virológica	119
6.3.2.2. Respuesta inmunológica	120
6.3.2.3. Fracasos virológicos y abandonos	121
6.3.3. Pacientes que inician maraviroc con viremia basal indetectable	122
6.3.3.1. Respuesta virológica	123
6.3.3.2. Respuesta inmunológica	123
6.3.3.3. Fracasos virológicos y abandonos	125
6.3.4. Caracterización de la región V3 en el fracaso	126
6.4. Discusión	127
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	139
ABREVIATURAS	153
ANEXOS	157
ANEXO I: Publicaciones surgidas de esta tesis	159
ANEXO II: Copia de las publicaciones relacionadas con esta tesis	161

RESUMEN

Maraviroc es el primer antagonista de CCR5 aprobado para el tratamiento de la infección por VIH-1. Su actividad es específica frente a variantes virales R5-trópicas, lo que ha generado la necesidad de disponer de pruebas de laboratorio para la determinación del tropismo del VIH-1 en la práctica clínica. En los ensayos clínicos de registro de maraviroc, la determinación del tropismo del VIH-1 se realizó con el ensayo fenotípico Trofile® (Monogram Biosciences). Esta prueba, a pesar de demostrar su capacidad para seleccionar pacientes respondedores y no respondedores a maraviroc, presenta limitaciones técnicas y logísticas que dificultan su utilización en la práctica clínica.

Los métodos genotípicos, que permiten determinar el tropismo viral a partir del análisis de la región V3 de la envuelta viral, se presentan como una alternativa económica, rápida y fácil de realizar en cualquier laboratorio especializado en VIH que cuente con tecnología para realizar estudios genotípicos. Sin embargo, antes de su utilización en la práctica clínica, estas herramientas han de ser evaluadas comparándose con ensayos fenotípicos y siendo validadas como predictores de respuesta a maraviroc.

En la presente tesis se presentan 4 estudios:

- El primero evaluó la concordancia entre herramientas genotípicas y fenotípicas para la determinación del tropismo viral, observando concordancias de hasta el 85%, con una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de variantes X4-trópicas.

- En el segundo estudio se optimizó y validó en una cohorte independiente de pacientes VIH+ la herramienta genotípica WebPSSM, aumentando su sensibilidad para la detección de variantes X4-trópicas desde un 59%-61% hasta el 93%.
- El tercer estudio analizó la dinámica del tropismo viral en pacientes VIH+ que recibieron tratamiento antirretroviral, informando de frecuencias de cambio del 12% al 19% tras más de 2 años de terapia. Estos resultados apoyan indirectamente la utilización de muestras de ADN proviral para la determinación genotípica del tropismo viral en el contexto de viremia indetectable, siendo una alternativa válida el empleo de muestras de plasma almacenadas antes del inicio de la terapia.
- El último estudio evalúa la capacidad de las herramientas genotípicas para identificar pacientes potencialmente respondedores a maraviroc. Los pacientes VIH+ que inician maraviroc atendiendo a la determinación genotípica del tropismo viral tienen tasas de respuesta virológica que superan el 80% tras 24 meses de tratamiento en estrategias de rescate virológico, o el 90% en cambios de tratamiento con viremia indetectable con el fin de minimizar toxicidades, facilitar el cumplimiento o incrementar el recuento de células T CD4+.

En resumen, los resultados obtenidos demuestran la fiabilidad de las herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral, atendiendo al nivel de concordancia respecto a los ensayos fenotípicos y al grado de respuesta obtenido al utilizar antagonistas de CCR5.

INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura del VIH-1

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) pertenece a la familia *retroviridae*, género *lentivirus*, y fue identificado en 1983 como el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA (Barré-Sinoussi et al., 1983, Gallo et al., 1983). La infección por VIH-1 se caracteriza por un deterioro progresivo del sistema inmunológico como consecuencia de un descenso paulatino en el nivel de linfocitos T CD4+, principal diana del virus (Barré-Sinoussi et al., 1983; Popovic, 1984). A medida que evoluciona la infección, el deterioro del sistema inmunológico facilita la aparición de infecciones por microorganismos patógenos u oportunistas.

Morfológicamente, los viriones del VIH-1 son esféricos y de aproximadamente 110 nm de diámetro. Están rodeados por una envuelta lipídica de origen celular que rodea la cápside icosaédrica viral. Dicha cápside o *core* contiene a su vez una nucleocápside helicoidal que alberga el material genético del virión, 2 hebras de ARN de polaridad positiva (**figura 1**).

La envuelta viral está formada por una bicapa lipídica en la que se insertan las glicoproteínas gp120 y gp41, ambas codificadas por el gen de la envuelta viral. A continuación, se encuentra la matriz formada por la proteína p17 (MA o de la matriz), seguida de la cápside viral formada por la proteína p24 (CA o de la cápside) y estabilizada por la proteína p6. El material genético del virus se localiza dentro de la cápside viral en interacción con la proteína p7 (NC o de la nucleocápside). Además, las enzimas virales transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN) así como las proteínas

reguladoras Vif, Vpr y Nef se encuentran en el interior de la cápside. La proteasa (PR) viral se encuentra entre la cápside y la matriz. (Emerman et al., 1998; Varmus, 1998; Seelamgari et al., 2004).

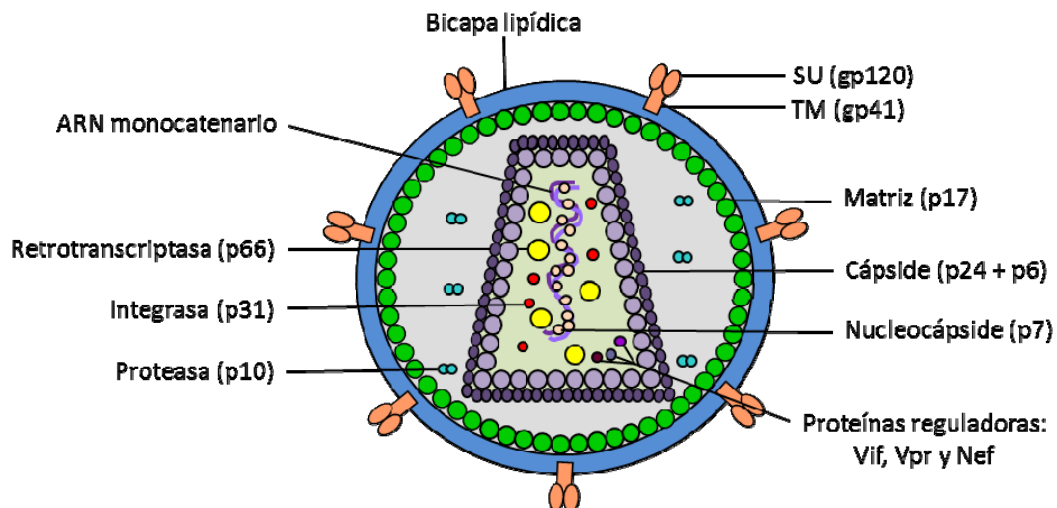


Figura 1. Estructura del virión del VIH-1.

El genoma del VIH-1 consiste en una hebra de ARN de aproximadamente 9719 nucleótidos de longitud, lineal, no segmentada, de cadena sencilla y polaridad positiva. En cada partícula vírica hay dos copias idénticas de esta molécula de ARN genómico, cuyos extremos 5' están unidos entre sí por puentes de hidrógeno, lo que hace de la familia de los retrovirus los únicos virus animales cuyo genoma es diploide.

Estructuralmente, el genoma del VIH-1 está formado por tres genes principales: *gag*, *env* y *pol* (**figura 2**). *Gag* y *env* codifican para las proteínas estructurales, mientras que *pol* codifica las enzimas virales esenciales para el ciclo replicativo. Adicionalmente, alrededor de la región de *env*, se sitúan en diferentes marcos de lectura las regiones

codificantes de las proteínas reguladoras Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr y Vpu. El genoma del VIH-1 se encuentra flanqueado en ambos extremos 3' y 5' por las regiones LTR (*Long Terminal Repeat*), que desempeñan un papel crucial en la replicación del genoma viral así como en su integración al genoma de la célula hospedadora (Karpas, 2004, Flint et al., 2000).

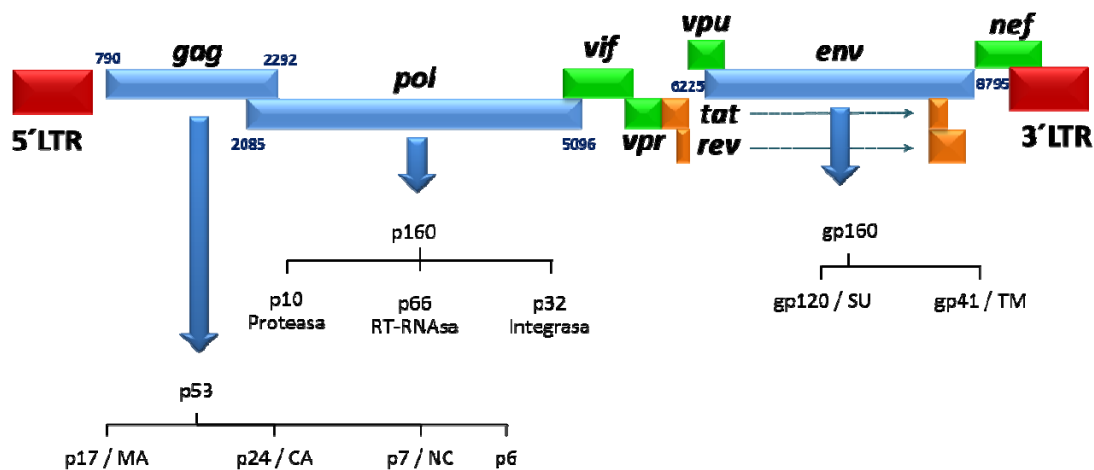


Figura 2. Estructura del genoma del VIH-1.

En la **tabla 1** se muestran los diferentes genes codifican para las distintas proteínas del virus, así como su función.

Gen	Proteína	Función biológica
<i>gag</i>	p24 (CA)	Proteína estructural que forma la cápside viral.
	p17 (MA)	Proteína estructural que forma la matriz.
	p7 (NC)	Nucleoproteína asociada a las moléculas de ARN genómico.
	p6	Proteína implicada en la liberación del virión.
<i>pol</i>	p10 (PR)	Proteasa viral. Interviene en el procesamiento post-traducciona de gag y gag-pol.
	p66 (RT)	Transcriptasa Inversa: con actividad polimerasa y RNasa H. Cataliza la copia del ARN viral genómico monohebra a ADN bicatenario.
	p31 (IN)	Integrasa viral. Encargada de integrar el ADN proviral en el genoma de la célula huésped.
<i>env</i>	gp120 (SU)	Proteína de superficie de la envuelta. Interacciona con la molécula CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4.
	gp41 (TM)	Proteína transmembrana de la envuelta. Implicada en el anclaje de gp120 y en la fusión de las membranas viral y celular.
<i>tat</i>	Tat	Factor de transactivación transcripcional. Crítica para el inicio y elongación de la transcripción.
<i>rev</i>	Rev	Regulador del transporte y procesamiento del ARNm viral.
<i>nef</i>	Nef	Regulador negativo de CD4 y MHC-I en la membrana celular.
<i>vif</i>	Vif	Factor de infectividad viral que inhibe la acción de las proteínas antivirales celulares, entre ellas APOBEC3G.
<i>vpr</i>	Vpr	Implicada en la integración del genoma viral, la transactivación de genes del hospedador y en la parada del ciclo celular.
<i>vpu</i>	Vpu	Implicada en el bloqueo de CD4 en el retículo endoplásmico para evitar la interacción prematura con gp120 de nueva síntesis.

Tabla 1. Genes del VIH-1, proteínas y función biológica.

1.2. Ciclo replicativo del VIH-1

El ciclo replicativo del VIH-1 se puede dividir en (**Figura 3**) (Carrasco et al., 2006):

1. **Entrada del virus en la célula diana.** El VIH-1 inicia su ciclo replicativo mediante la unión entre la glicoproteína viral gp120 y el receptor celular CD4. Seguidamente, el complejo CD4-gp120 interacciona con CCR5 o CXCR4, provocando un cambio conformacional en la glicoproteína gp41 que promueve la fusión entre las membranas viral y celular, liberándose la cápside viral en el interior celular. Esta fase se describirá con más detalle en el apartado siguiente.
2. **Decapsidación.** Consiste en la degradación de la cápside viral en el citosol, lo que provoca la liberación de su material genético. Aunque esta etapa no está completamente caracterizada, se han identificado varios factores celulares de inmunidad innata que inhiben este paso, tales como Ref-1 o TRIM5- α .
3. **Transcripción reversa.** Constituye el procesamiento del genoma viral desde ARN monohebra a ADN bicatenario, también llamado proviral. Esta etapa está catalizada por la enzima viral retrotranscriptasa (RT), siendo también importantes las acciones de la proteína viral Vif, que aumenta la eficacia de la retrotranscripción, y Nef, que inhibe la actuación de la proteína celular APOBEC3G.
4. **Integración.** El complejo de preintegración del núcleo se forma en el citosol a partir del ADN viral bicatenario, la integrasa, la RT, la matriz, Vpr y la proteína celular HMG-1. Este complejo migra al núcleo, donde la integrasa inserta el

material genético viral en el celular. Tras su integración, el VIH puede permanecer latente, o bien iniciar su replicación masiva con el consiguiente efecto citopático.

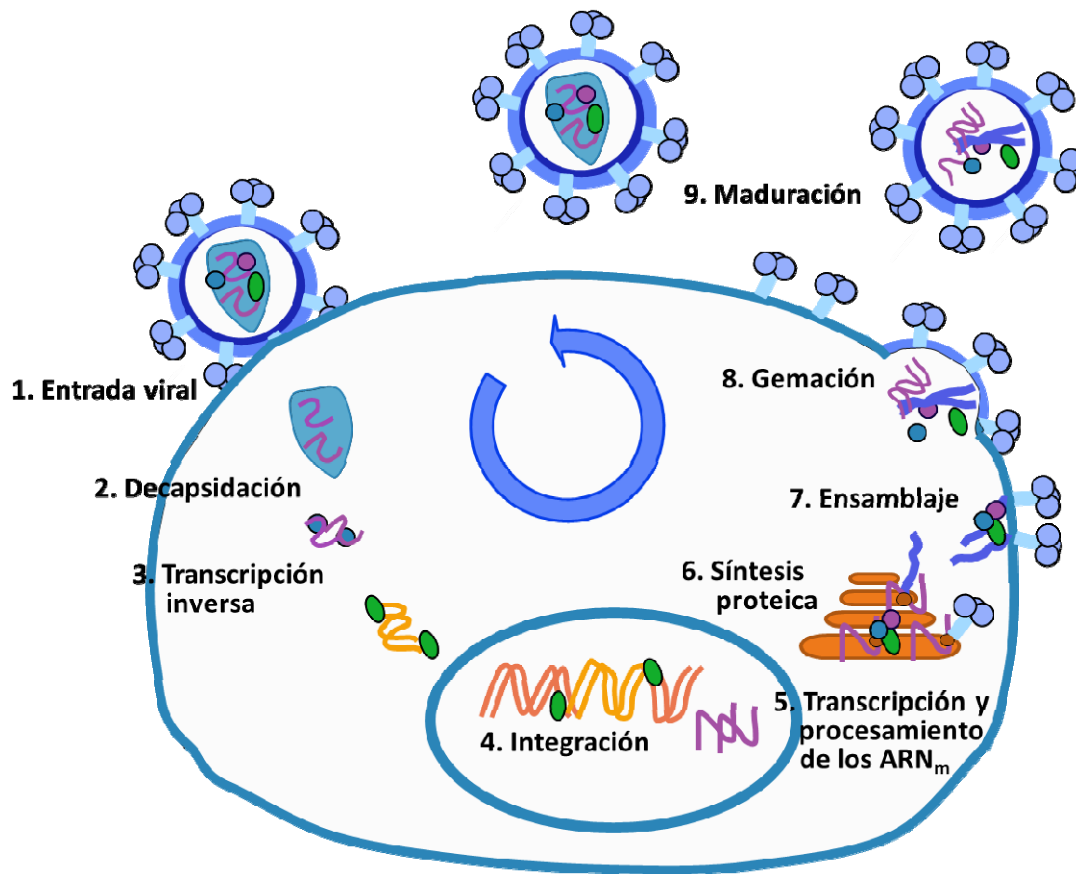


Figura 3. Ciclo replicativo del VIH-1.

- 5. Transcripción y procesamiento del ARN mensajero.** Algunos transcritos del ADN proviral integrado son procesados y transportados al exterior del núcleo, donde dan lugar a las proteínas tempranas Tat, Rev y Nef. Alcanzados ciertos niveles de dichas proteínas, Rev facilita el transporte del resto de transcritos al citosol, donde se traducen de forma masiva.

6. **Síntesis, circulación y procesamiento de las proteínas.** En el retículo endoplásmico, se sintetiza la proteína viral env (gp160), que oligomeriza en trímeros y es glicosilada. Tras su rotura proteolítica en el aparato de Golgi, env produce un complejo trimérico de dos glicoproteínas asociadas no covalentemente (TM-SU)₃. Estos trímeros TM-SU (gp41-gp120) son transportados a la membrana plasmática celular, donde se integran. Su endocitosis vía clatrina es responsable de la escasa incorporación de env en las partículas virales (Zhu et al., 2003, 2006, 2008), lo que contribuye a la eficiente evasión de la respuesta inmune del hospedador, así como a reducir la citopatogenicidad. Durante esta fase, Nef secuestra las moléculas CD4 y MHC-1 de la membrana celular, evitando la presentación de antígenos virales en la superficie celular. Otros ARNm dan lugar a la poliproteína gag y, por cambio de marco de lectura y en menor proporción (5% de los casos), a gag-pol. Ambas poliproteínas se asocian a la membrana celular a través de la interacción con la cola citoplásmica de TM (gp41).
7. **Ensamblaje.** Fase en la que las proteínas y moléculas de ARN virales se aproximan a la membrana celular para la formación del virión. Se han descrito afinidades entre algunas de las proteínas virales entre sí y con el ARN genómico viral, aunque la mayor parte de cómo ocurre este proceso es aún desconocido.
8. **Gemación.** Una extensión de la membrana celular que contiene los componentes virales agrupados en la fase anterior se separa del resto de la célula dando lugar al nuevo virión.

9. **Maduración.** Liberado el virión de la célula infectada se activa la proteasa viral que procesa las poliproteínas gag y gag-pol, dando lugar a las proteínas estructurales MA, CA, NC y p6, cuyo reordenamiento formará la partícula viral madura.

1.3. Entrada del VIH-1 en la célula

La entrada del VIH-1 en la célula diana es un proceso que consta fundamentalmente de tres etapas (**figura 4**):

1. Unión de la glicoproteína de la envuelta gp120 al receptor celular CD4

El contacto inicial entre el virus y la célula ocurre por interacciones electromagnéticas inespecíficas entre gp120, cargada positivamente, y proteoglicanos de la membrana celular, cargados negativamente (Mondor et al., 1998; Moulard et al., 2000). Además, ciertas lectinas de la superficie celular como DC-SIGN interactúan específicamente con el virus, aumentando la eficiencia de infección (Geijtenbeek et al., 2000).

Producida la aproximación entre virus y célula, tiene lugar la interacción entre la glicoproteína viral gp120 y el receptor celular CD4, receptor celular primario del VIH-1 que se expresa en monocitos, macrófagos, células dendríticas y en varios subgrupos de células T (Kwong et al., 1998). Dicha interacción produce un cambio conformacional en la estructura de gp120. En primer lugar, 2 grupos de láminas β virales que estaba separadas en el espacio, se agrupan formando un dominio denominado *bridging sheet* (Chen et al., 2005, 2009; Kwong et al., 1998). En segundo lugar, las regiones V1, V2 y

V3 se desplazan quedando más accesibles para su posterior interacción con la célula. En tercer lugar, la orientación de gp120 varía, de modo que el *bridging sheet* y la región V3 se orientan hacia la membrana celular, mediando la sucesiva interacción con el receptor secundario o correceptor (Huang et al., 2005; Trkola et al., 1996; Wu et al., 1996).

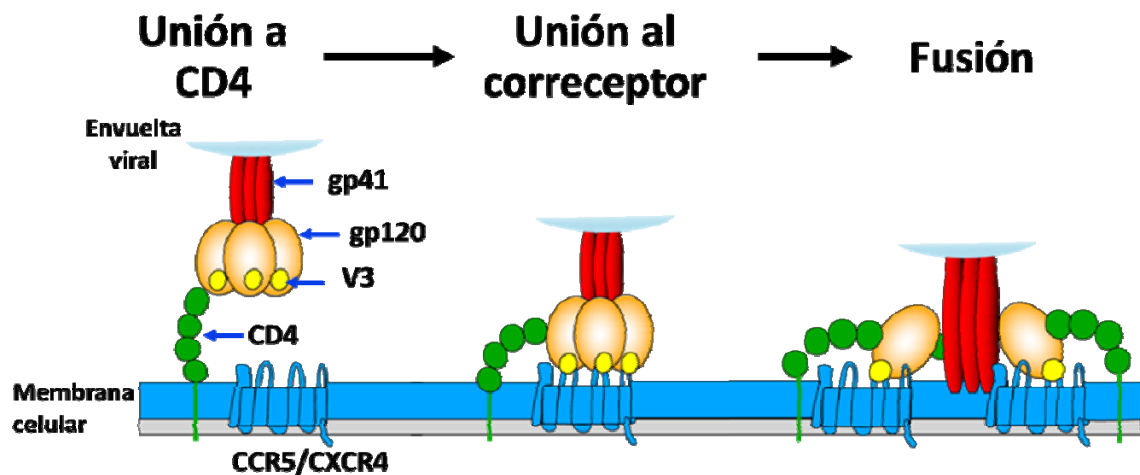


Figura 4. Proceso de entrada viral del VIH-1

II. Interacción del complejo CD4-gp120 con los receptores CCR5 o CXCR4

Los principales correceptores o receptores secundarios utilizados por el VIH-1 para la entrada viral *in vivo* son los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, ambos miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G (Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996; Oberlin et al., 1996; Zhang et al., 1998).

CCR5 y CXCR4 son proteínas integrales de membrana con 7 hélices transmembrana, un dominio N-terminal extracelular y 3 lazos extracelulares (*extracellular loop*; ECL) que forman un pequeño bolsillo. La interacción entre gp120 y el correceptor celular CCR5 ocurre a 2 niveles: entre el dominio N-terminal del correceptor que interacciona con el *bridging sheet* y la base del lazo V3 viral, y también entre el segundo lazo extracelular (ECL2) del correceptor que interacciona con la corona del lazo V3 viral. La afinidad y dependencia relativa del virus hacia el ECL2 o la zona N-terminal de CCR5 varía en los diferentes virus que interaccionan con CCR5, también llamados R5-trópicos (Basmaciogullari et al., 2002; Cormier et al., 2001, 2002; Hoffman et al. 1999; Huang et al., 2007).

La unión de gp120 con CXCR4 parece ocurrir de un modo muy similar (Basmaciogullari et al., 2002; Chabot et al., 1999; Doranz et al. 1999; Lin et al., 2003), a pesar de que el dominio V3 de los virus que interaccionan con CXCR4 (X4-trópicos) tienda a estar más cargado positivamente, especialmente en los aminoácidos 11, 24 y 25 (De Jong et al., 1992; Fouchier et al., 1992; Milich et al., 1993; Xiao et al., 1998).

III. Fusión de las membranas viral y celular

La unión de gp120 con el correceptor celular CCR5 o CXCR4 provoca nuevos cambios conformacionales en el heterotrímero viral, particularmente en la glicoproteína gp41. Dicha proteína expone su región N-terminal o péptido de fusión, el cual se inserta en la membrana celular de la célula huésped. Tras dicha inserción, los dominios HR1 (*heptad repeat 1*) y HR2 (*heptad repeat 2*) de gp41 sufren un reordenamiento energéticamente

muy favorable en el que uno se pliega sobre el otro, acortando las distancias entre las membranas viral y celular. En un heterotrímero viral funcional esto provoca la formación de un complejo de 6 hélices (*six hélix bundle*) donde los 3 dominios HR1 forman una hélice central alrededor de las cuales se enrollan los dominios HR2 en dirección antiparalela (Chan et al., 1997; Weissenhorn et al. 1997). Este reordenamiento estructural produce un acercamiento entre la región transmembrana de gp41, que está insertada en la envuelta viral, y el péptido de fusión, que está insertado en la membrana celular. Dicha yuxtaposición conduce a la formación del poro de fusión, lo que permite que la cápside viral se introduzca en el interior celular.

1.4. Inhibidores de entrada: antagonistas de CCR5

La entrada viral es el primer paso del ciclo de replicación del VIH y por tanto representa una importante diana para la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la infección por VIH. La familia de los inhibidores de la entrada está constituida por un grupo heterogéneo de agentes que pueden actuar en cualquiera de las diferentes etapas del proceso de entrada viral: i) unión de la glicoproteína gp120 de la envuelta viral al receptor CD4, ii) unión de gp120 a los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, y iii) fusión de la membrana viral y celular (Tilton et al., 2009). El inhibidor de la fusión **enfuvirtida** (T-20) y el antagonista de CCR5 **maraviroc** (MVC), son hasta el momento los únicos inhibidores de la entrada aprobados para el tratamiento de la infección por VIH. Actualmente, existen otros compuestos dentro de la familia de

los inhibidores de la entrada que se encuentran en desarrollo clínico y preclínico (Martin et al., 2011; Nowicka-Sans et al., 2011; Pace et al., 2011). Desde la aprobación de nuevos antirretrovirales orales de gran eficacia como darunavir, raltegravir, maraviroc y etravirina, el uso de T-20 se ha restringido fundamentalmente a pacientes con opciones terapéuticas muy limitadas.

Los antagonistas de los receptores de quimiocinas inhiben el segundo paso del proceso de entrada del VIH en la célula. En esta segunda etapa, ocurre la interacción entre el virus con el correceptor celular (CCR5 y/o CXCR4) principalmente a través de la región V3 de gp120. Dicha interacción es imprescindible para que se complete el proceso de entrada viral. Los antagonistas de CCR5 se unen al correceptor celular CCR5 provocando un cambio conformacional que impide su futura interacción con la región V3 de la envuelta viral, inhibiendo así el proceso de entrada viral. Debido a su mecanismo de acción, la actividad antiviral de los antagonistas de CCR5 está limitada a variantes R5-trópicas del VIH-1. De hecho, la presencia de variantes X4-trópicas se ha asociado con fracasos al tratamiento con estos fármacos. Por esta razón, es necesaria la determinación del tropismo viral en aquellos pacientes candidatos a iniciar un tratamiento con estos fármacos.

1.4.1. Maraviroc

Maraviroc (UK-427857, MVC) es el primer antagonista de CCR5 aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, bajo el nombre comercial de Selzentry®) y la EMA

(*European Medicines Agency*, bajo el nombre comercial de Celsentri®) para el tratamiento de la infección por VIH-1. Se trata de un inhibidor alostérico del correceptor CCR5, de administración oral, con potente actividad antiviral y constituye el primer fármaco para el tratamiento de la infección por VIH-1 cuya diana de acción no es viral, sino celular. Maraviroc se une a la cavidad transmembrana del receptor CCR5 entre los dominios 2, 3, 6 y 72 (Westby et al., 2005). Dicha unión produce una serie de cambios conformacionales, especialmente en la región ECL2 (*extracellular loop 2*), que impiden la interacción con la región V3 de gp120, inhibiendo así el proceso de entrada viral (Figura 5).

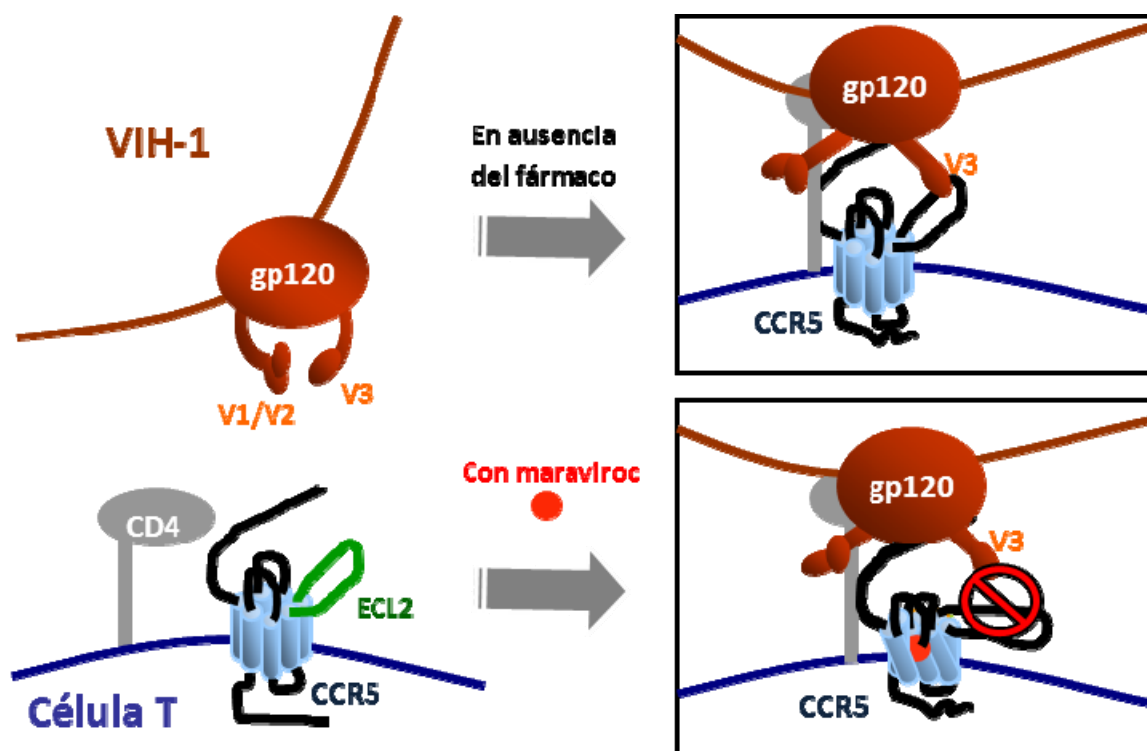


Figura 5. Mecanismo de acción de maraviroc.

En sus fases preclínicas de desarrollo maraviroc demostró potente actividad antiviral frente a todos los virus R5-trópicos que se ensayaron, incluyendo 43 aislados de varios subtipos genéticos y procedencia geográfica. También fue efectivo frente a más de 200 virus recombinantes creados a partir de muestras clínicas, 100 de los cuales presentaban resistencias a otras familias de antirretrovirales (Door et al., 2005). Además demostró no afectar a los niveles de CCR5 de la superficie celular ni estar asociado a ninguna cascada de señalización intracelular, lo que lo confirma su especificidad de unión y acción antagonista. Tampoco se detectó citotoxicidad en experimentos *in vitro*. Es altamente selectivo a la unión con CCR5, lo que se ha confirmado con pruebas de adherencia hacia varios tipos de receptores y enzimas celulares, y que avala su excelente perfil de seguridad (Wood et al., 2005).

Los ensayos clínicos MOTIVATE demostraron la eficacia y seguridad de maraviroc a dosis de 150 o 300 mg, dos veces al día, en comparación con placebo en pacientes pretratados infectados exclusivamente con virus R5-trópicos, siempre junto con un tratamiento antirretroviral optimizado. A semana 48, la proporción de pacientes que alcanzaron viremia indetectable (<50 copias ARN-VIH/mL) fue superior en la rama que recibían maraviroc frente al grupo que recibía placebo (46 vs 17%) (Gullick et al., 2008). Los resultados se confirmaron a semana 96 (Hardy et al., 2010). Esta diferencia en la respuesta virológica en comparación con el placebo fue comparable a la observada con otros potentes fármacos de reciente aprobación, tales como darunavir o raltegravir (Clotet et al., 2007; Steigbigel et al., 2008). En base a los resultados de los ensayos MOTIVATE, la FDA y la EMA aprobaron maraviroc para el tratamiento de la

infección por VIH-1 en pacientes pretratados en agosto y septiembre de 2007, respectivamente.

La eficacia y seguridad de maraviroc también se ha evaluado en pacientes no expuestos a tratamiento antirretroviral previamente (naïve) (Cooper et al., 2010). El ensayo MERIT evaluó la eficacia de maraviroc como terapia de inicio en comparación con efavirenz, en ambos casos combinados con zidovudina/lamivudina coformuladas (Combivir®). Inicialmente, el ensayo no consiguió demostrar la no inferioridad de maraviroc frente a efavirenz según el criterio de eficacia principal, proporción de pacientes con viremia indetectable (<50 copias/mL) a semana 48. Estos datos fueron revisados en un análisis *post hoc* utilizando el ensayo ESTA® (*Enhanced Sensitivity Trofile Assay*) para el cribado de pacientes, una versión mejorada del ensayo fenotípico de Trofile® de 10 a 100 veces más sensible para la detección de virus X4-trópicos. Tras la exclusión de un 14,7% del total de pacientes inicialmente incluidos por presentar virus X4-trópicos según ESTA®, la eficacia virológica entre los dos regímenes antirretrovirales fue comparable (Cooper et al., 2010). Del mismo modo, cuando se utilizaron herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral basadas en secuenciación poblacional para la inclusión de pacientes en el estudio, se demostró la no inferioridad de maraviroc con respecto a efavirenz para el tratamiento de pacientes naïve (McGovern et al., 2010a). Los reanálisis *post hoc* del ensayo MERIT han generado controversia sobre el papel de maraviroc en el tratamiento de pacientes naïve, hasta tal punto que la FDA recomendó expandir el uso de maraviroc para el

tratamiento de pacientes naïve en noviembre de 2009, mientras que la EMA no respalda actualmente dicha indicación.

El tratamiento con maraviroc parece tener asociado un beneficio inmunológico destacable. Así, en los estudios MOTIVATE y MERIT la ganancia de células T CD4+ a semana 48 fue significativamente mayor en la rama de maraviroc frente a las ramas comparadoras (MOTIVATE: 120 vs. 61 células/mm³ y MERIT: 170 vs. 144 células/mm³). Este incremento en el nivel de células T CD4+ hace que maraviroc sea una opción atractiva de considerar en terapias de intensificación para el tratamiento de pacientes en los que la respuesta inmunológica es deficiente a pesar de alcanzar niveles indetectables de viremia.

Maraviroc es un fármaco muy bien tolerado con buen perfil de seguridad. Los ensayos clínicos en los que ha participado el fármaco muestran que la aparición de efectos adversos graves en las ramas de maraviroc es excepcional, registrándose únicamente efectos adversos leves como náusea, rinitis, mareo y dolores de cabeza, siempre en menor frecuencia a los registrados en las ramas comparadoras. Tampoco se ha asociado con ningún tipo de complicación hepática, de anomalías en el metabolismo lipídico o el desarrollo de ningún tipo de neoplasia (Cooper et al., 2010; Hardy et al., 2010). En cualquier caso, dada la reciente aprobación del fármaco, será necesario esperar nuevos análisis para confirmar el excelente perfil de seguridad de maraviroc, también a largo plazo.

1.4.2. Otros antagonistas de CCR5

En febrero de 2010 se publicaban los resultados de eficacia y seguridad de los estudios en fase III VICTOR E3 y VICTOR E4 del antagonista del correceptor CCR5 vicriviroc (SCH-D) (Suleiman et al., 2010). El estudio, en el que pacientes pretratados con virus R5-trópicos recibieron vicriviroc a dosis de 20 ó 30 mg una vez al día o placebo junto con un tratamiento antirretroviral optimizado, no pudo demostrar la superioridad de vicriviroc frente a placebo, por lo que no se continuará con su desarrollo para pacientes pretratados. En base a los resultados en fase II de pacientes naïve, tampoco se continuará el desarrollo de vicriviroc en esta clase de pacientes (Comunicado de prensa, datos no publicados).

Cenicriviroc (TBR-652) ha demostrado una potente actividad antirretroviral *in vivo* tras 10 días de monoterapia en pacientes VIH+ (Lalezari et al., 2011). Este antagonista de CCR5 presenta también actividad antagonista hacia el receptor CCR2, lo que puede suponer un efecto antiinflamatorio adicional al de la inhibición de la replicación antirretroviral. Actualmente existe un ensayo en fase 2b cuyo objetivo es demostrar la no inferioridad de dicho fármaco frente a efavirenz como inicio de la terapia antirretroviral en pacientes naïve.

PRO-140 es un anticuerpo monoclonal que bloquea la entrada del VIH en la célula y representa una nueva clase de antagonistas de CCR5. En este caso, el sitio de unión de PRO-140 es extracelular, e inhibe la interacción entre la envuelta del VIH y el receptor CCR5 por un mecanismo de inhibición competitiva. PRO-140 debe ser administrado por

inyección subcutánea/endovenosa una vez por semana y ha demostrado potente actividad antiviral (Jacobson et al., 2008, 2010).

1.5. Tropismo viral: definición y bases moleculares

La definición de tropismo viral ha variado desde que a finales de la década de los 80 se identificasen 2 variantes fenotípicas del VIH. En este primer momento, el tropismo hacía referencia al efecto citopático del VIH en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en cultivos. Así, existían virus que inducían la formación de sincitios, creados por la fusión de células infectadas (adquiriendo un aspecto de células gigantes multinucleadas), mientras que el resto fueron clasificados como no inductores de sincitios (Asjö et al., 1986; Tersmette et al., 1988). También se propuso una segunda clasificación basada en la cinética de replicación viral, denominándola alta/rápida (inductor de sincitios) o baja/lenta (no inductor de sincitios) (Evans et al., 1987; Cheng-Mayer et al., 1988; Fenyö et al., 1988). Más adelante, se propuso una nueva clasificación basada en el tipo celular que infectaban las distintas variantes del VIH-1, estableciéndose las variantes M-trópicas, que infectaban a monocitos y macrófagos, y las T-trópicas, que infectaban a células T CD4⁺ (Schuitemaker et al., 1991, 1992; Collman et al., 1989).

En 1996 se identificaron los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 como componentes principales para completar el proceso de entrada viral, además del receptor celular CD4. Este descubrimiento clarificó las bases moleculares para los

fenotipos anteriormente descritos. Se observó que las variantes no inductoras de sincitios (*non-syncytium inducing*, NSI), que además eran generalmente M-trópicas, utilizaban el correceptor CCR5 para entrar en la célula, mientras que las cepas inductoras de sincitios (*syncytium inducing*, SI) y T-trópicas utilizaban el correceptor CXCR4 (Berger, 1997; Moore et al., 1997; Doms et al., 1997).

Estos hallazgos permitieron establecer una nueva clasificación para los aislados del VIH-1 basándose en el uso del correceptor. Según esta clasificación, las variantes virales R5-trópicas son las que utilizan el correceptor CCR5 para la entrada viral y las CXCR4-trópicas las que utilizan el correceptor CXCR4. Las variantes dual-trópicas son las que pueden utilizar cualquiera de los 2 correceptores (**figura 6**) (Berguer et al., 1998). El término de tropismo viral dual-mixto hace referencia a la existencia de variantes virales de tropismo propiamente dual-trópico o bien a poblaciones virales que presentan variantes R5-, X4- y/o dual-trópicas. Desde un punto de vista práctico, este término se utiliza para referirnos a muestras con un tropismo viral no-R5 trópico.

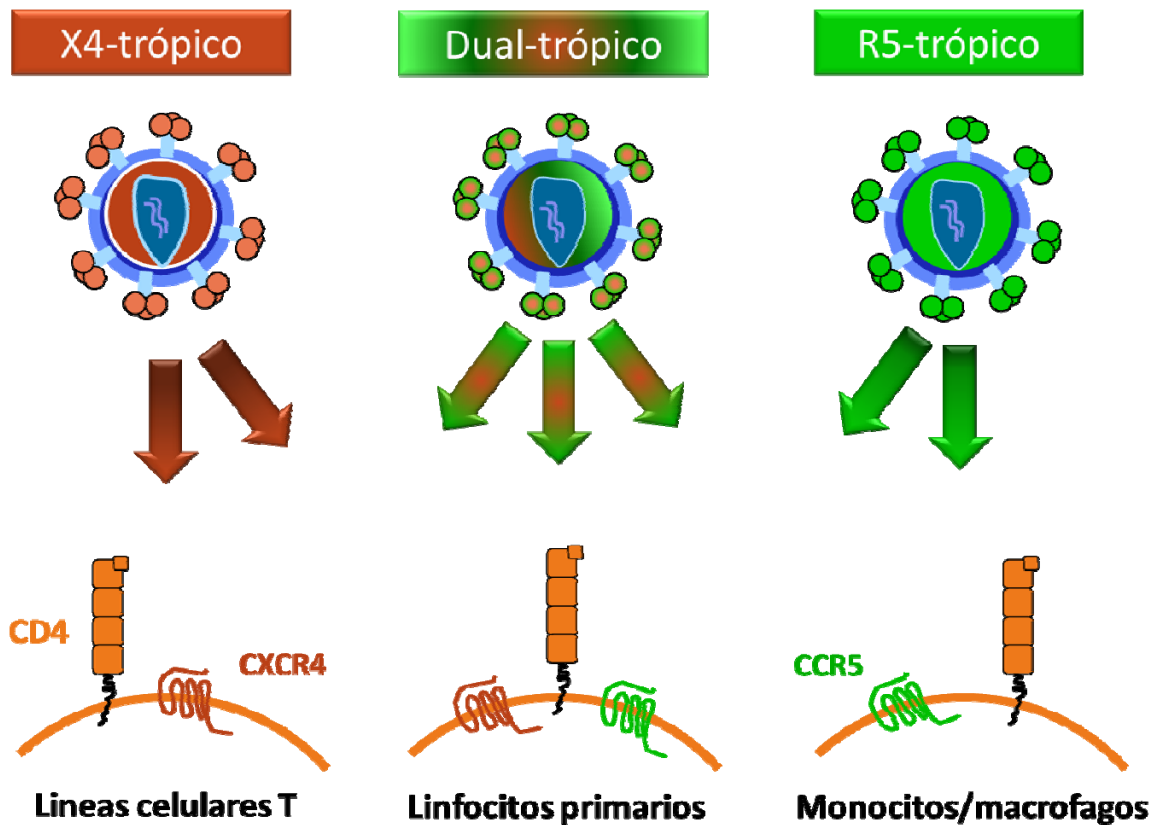


Figura 6. Variantes del VIH-1 en función de su tropismo viral.

1.6. Dinámica del tropismo viral durante la progresión de la enfermedad

Diferentes estudios han demostrado la asociación entre el tropismo viral y la progresión de la infección por VIH-1. Las variantes R5-trópicas parecen ser las responsables del establecimiento de la infección independientemente de la ruta de transmisión (Connor et al., 1997; Schuitemaker et al., 1992), y predominan en fases tempranas de la infección, principalmente durante la fase asintomática (Pope et al., 2003). Durante la fase crónica, entre un 40 y un 60 % de los individuos desarrollan

variantes X4-trópicas del virus, lo que se relaciona con una caída significativa de linfocitos T CD4+ así como con una progresión más rápida de la enfermedad. (Schuitemaker et al., 1992; Brumme et al., 2005; Daar et al., 2007; Moyle et al., 2005; Koot et al., 1993; Tersmette et al., 1988; Richman et al., 1994) (**Figura 7**). Sin embargo, también se observa progresión de la infección en pacientes infectados exclusivamente por variantes R5-trópicas. Los mecanismos que explican este fenómeno no están completamente caracterizados, aunque se ha relacionado con un incremento en la capacidad replicativa o infectiva de las variantes R5-trópicas de larga evolución (Schuitemaker et al., 1992).

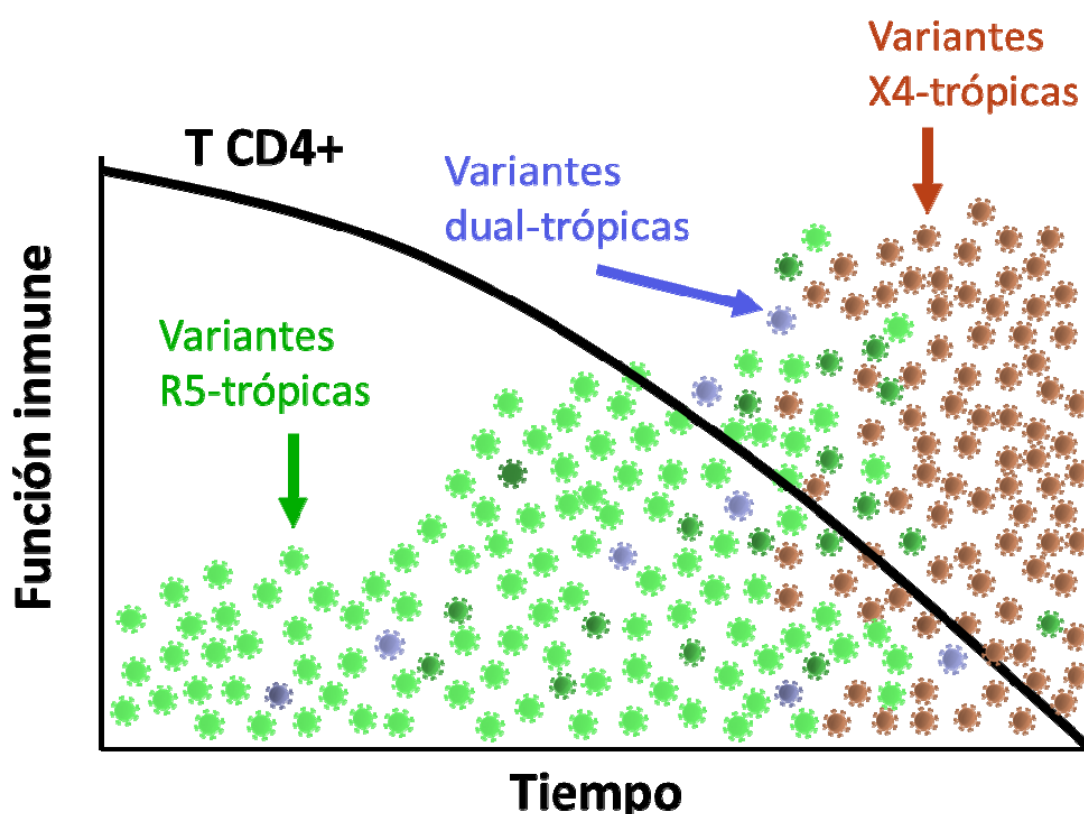


Figura 7. Evolución del tropismo viral a lo largo de la infección por VIH-1.

Existen diferentes mecanismos moleculares que podrían explicar porque las variantes R5-trópicas son las responsables del establecimiento de la infección. En primer lugar, existe una mayor expresión del correceptor CCR5 con respecto al CXCR4 en los tipos celulares que ocupan la mucosa genital (Fear et al., 1998; Zaitseva et al., 1997). Además, las partículas virales fundadoras son transportadas en primer lugar a los nódulos linfáticos, donde infectan células T (Moore et al., 2004; Pope et al., 2003), que también presentan mayores niveles de CCR5. Por último, el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) constituye el principal sitio de replicación del VIH-1 en humanos (Veazey et al., 1998; Harouse et al., 1999; Brenchey et al., 2004; Mehandru et al., 2004; Li et al., 2005; Matapallil et al., 2005), además de presentar el mayor reservorio de células T CD4+ de memoria que expresan CCR5.

Otro factor importante a tener en cuenta es que las variantes X4-trópicas del virus son más susceptibles a la acción del sistema inmunológico debido, principalmente, a la menor cantidad de sitios de glicosilación que poseen en gp120. Por ello, otra hipótesis acerca de su emergencia consiste en que se generan como consecuencia de una debilitación del sistema inmune, cuando este ya no es capaz de neutralizarlas (Schellekens et al., 1990; Tersmette et al., 1990; Miedema et al., 1990; Schreiber et al., 1996). Los estudios sobre la patogenicidad del VIH-1 según su tropismo han dado resultados controvertidos, sin resolver si las variantes X4-trópicas son naturalmente más patógenas y, por tanto, responsables de la progresión de la enfermedad o si la emergencia de dichas variantes es consecuencia del deterioro del sistema inmunológico, que no es capaz ya de evitar la aparición de las mismas (Shaheen et al.,

2004). Por tanto, todavía se desconoce si la aparición de variantes X4-trópicas es causa o consecuencia del deterioro del sistema inmune.

1.7. Uso clínico de los antagonistas de CCR5: determinación del tropismo viral en la práctica clínica

La aprobación de maraviroc, el primer antagonista de CCR5 para el tratamiento de la infección por VIH, con actividad específica frente a variantes virales R5-trópicas ha generado la necesidad de disponer de ensayos para la determinación del tropismo viral en aquellos pacientes candidatos a iniciar un tratamiento con dicho fármaco.

El tropismo viral por los receptores de quimiocinas puede ser determinado mediante métodos fenotípicos y genotípicos. A continuación se describen en detalle las características metodológicas así como sus principales ventajas e inconvenientes para su utilización en la práctica clínica.

1.7.1. Métodos fenotípicos

Los ensayos fenotípicos se basan fundamentalmente en la generación de virus recombinantes. En líneas generales, en estos ensayos el gen de la envuelta es amplificado a partir del ARN viral extraído del plasma del paciente y mediante técnicas de clonaje o recombinación genética se generan virus quiméricos que portan la envuelta del virus problema. Con el vector recombinante se transfecta una línea

celular que producirá el stock de virus recombinantes, utilizados para infectar líneas celulares que expresan el receptor CD4 y uno de los dos correceptores principales del VIH, CCR5 o CXCR4. La información del tropismo viral se inferirá en base al crecimiento viral en ambos cultivos (**Figura 8**).

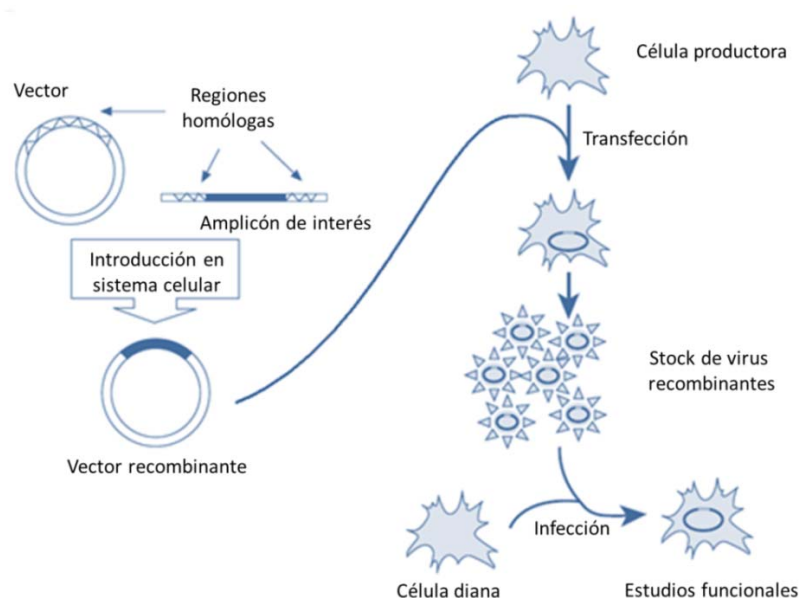


Figura 8. Esquema general de un ensayo fenotípico basado en la generación de virus recombinantes.

Desde el desarrollo y aprobación de maraviroc se han diseñado diferentes ensayos fenotípicos para la determinación del tropismo viral (**Tabla 2**). De ellos, el más utilizado ha sido el de Trofile® de Monogram BioSciences y su versión ESTA® (*Enhanced Sensitivity Trofile Assay*), más sensible para la detección de variantes X4-trópicas (Whitcomb et al., 2007). Hasta el momento, es el único método validado y aprobado por la FDA para la determinación del tropismo viral en pacientes candidatos a tratarse con maraviroc. En este ensayo se realiza la amplificación del gen de la envuelta viral a

partir del plasma del paciente. El vector resultante se cotransfecta en células 293T con un clon proviral que carece del gen de la envuelta y que contiene el gen marcador luciferasa. Los virus recombinantes obtenidos son utilizados para infectar células U87 que expresan CXCR4 o CCR5. La detección de fluorescencia en las líneas celulares nos indicará el tropismo viral de la muestra. En el momento actual este ensayo solo se realiza en Europa en muestras de plasma con cargas virales superiores a 1000 copias ARN/mL siempre que se envíe la muestra a San Francisco, EE.UU.

Además de Trofile®, existen otros ensayos fenotípicos que se diferencian principalmente en la región de la envuelta amplificada, el tipo de plásmido, la línea celular empleada para la generación de los virus recombinantes o el tipo de gen *reporter* de célula diana (**Tabla 2**).

	Monogram Trofile ES	VRalliance Phenoscript	Xtrack [®] /PhenX-R In Pheno AG	Virco NH ₂ -V4 gp120	Univ Toulouse Toulouse Tropism Test	ISCI-FISPE Tropitest
Amplicón	pCAX-PXMX (expresión env)+RTV1.F- lucP.CNDOΔU3	V1-V3 gp120	pNL4.3 defectivo env	pHXB2D-ΔNH ₂ - V4-eGFP	pNL43Δenv-Luc2 vector	pNL43-lacZ/env-
Generación del vector	Clonaje	Recombinación homologa	Clonaje	Recombinación	Recombinación homologa	Clonaje
Células diana	U87.CD4.CCR5	U373-CD4-CCR5	CXCR4	U87.CD4.CCR5	U87.CD4.CCR5	U87/Ghost/PBMC
	U87.CD4.CXCR4	U373-CD4-CXCR4	CCR5/CXCR4	U87.CD4.CXCR4	U87.CD4.CXCR4	CD4,CCR5
Gen marcador	Luciferasa	β-galactosidasa	β-galactosidasa	GFP	Luciferasa	Luciferasa
Replicación	Ciclo único	Ciclo múltiple	Ciclo único	Ciclo múltiple	Ciclo múltiple	Ciclo múltiple
Sensibilidad	0,3-1%	5-10%	1%	5-10%	0,5%	1%

Tabla 2. Características de los principales ensayos fenotípicos para la determinación del tropismo viral.

El empleo de estos test fenotípicos requiere una infraestructura adecuada para el manejo de virus recombinantes y cultivos virales, personal especializado en este tipo de técnicas, tiempo para la generación de virus recombinantes y crecimiento del virus en los cultivos, aparataje acondicionado para el revelado de la infección e incluso un procesamiento estadístico de los datos obtenidos.

1.7.2. Métodos genotípicos

Los métodos genotípicos se presentan como una alternativa más económica, rápida y factible de desarrollar localmente en cualquier laboratorio especializado de VIH que cuente con tecnología para realizar estudios genotípicos. Desde principios de los años noventa, se han descrito y desarrollado diferentes reglas y algoritmos de interpretación para la determinación del tropismo viral basados fundamentalmente en las características de la secuencia de aminoácidos de la región V3 de la envuelta viral (Sierra et al., 2007) (figura 9).

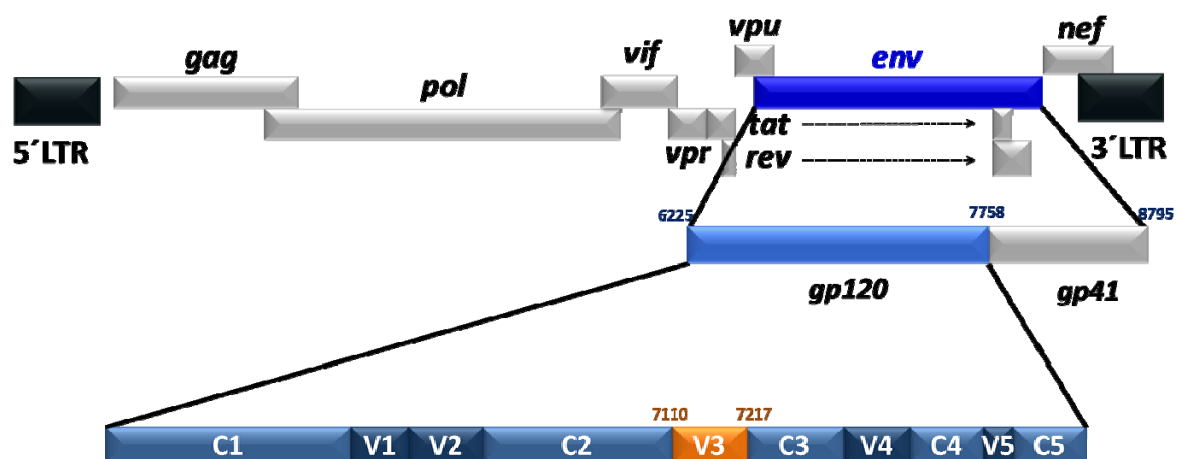


Figura 9. Localización de la región V3 en el genoma del VIH-1.

La regla 11/25 fue el primer algoritmo de interpretación propuesto, además de ser uno de los más sencillos y populares. Dicha regla se basa en la observación de que aquellos aislados que presentan aminoácidos básicos como la arginina (R) o la lisina (K) en las posiciones 11 y/o 25 se asocian con un fenotipo X4-trópico. La ausencia de R o K en estas posiciones se asocia con un tropismo R5-trópico (Isaka et al., 1999). El valor predictivo de esta regla mejoró al considerarse también la posición 24, dando lugar a la regla 11/24/25 (Cardozo et al., 2007; Delobel et al., 2007).

La regla de la carga neta es un sencillo algoritmo de interpretación que consiste en calcular de forma global la carga neta de la región V3 según la siguiente fórmula: $(K+R) - (D, \text{ácido aspártico} + E, \text{ácido glutámico})$. Si el resultado es mayor o igual que 5 el aislado viral es clasificado como X4-trópico, mientras que si es menor de 5 se considera R5-trópico. Existe una fórmula alternativa para calcular la carga neta que tiene en cuenta como aminoácido básico a la histidina (H), aunque esta alternativa parece ser menos exacta. De la misma forma que la regla 11/25, la regla de la carga neta presenta una gran especificidad para la clasificación de variantes X4-trópicas, aunque baja sensibilidad (Briggs et al., 2000).

A partir de las reglas 11/25 y carga neta se han propuesto algoritmos que combinan las predicciones de ambas. El algoritmo de Delobel (Delobel et al., 2007) considera un virus X4-trópico cuando ambas reglas así lo consideran, mientras que el algoritmo de Garrido (Seclén et al., 2010) considera un virus X4-trópico cuando cualquiera de ellas lo considera. Estos algoritmos han dado lugar a una mejora en la especificidad o sensibilidad de las predicciones, respectivamente.

El estudio de la variabilidad natural en secuencias de V3 y su asociación con los fenotipos R5- o X4-trópicos, ha permitido la identificación de nuevos residuos y patrones de aminoácidos en la región V3 relacionados con el tropismo viral. Con los datos obtenidos y a través de la utilización de diferentes métodos estadísticos se han diseñado sofisticados algoritmos de interpretación que permiten predecir el uso del correceptor del VIH-1 basándose en la secuencia genética de la región V3 de un determinado aislado viral (Resch et al., 2001, Sierra et al., 2007). La mayoría se encuentran disponibles en páginas web de libre acceso como Wetcat, Geno2pheno_{CORECEPTOR} y WebPSSM, que se describen a continuación.

Wetcat (<http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/tropism.html>). Es una herramienta desarrollada por la Universidad de California en el que residen distintos clasificadores de tropismo viral: 3 basados en árboles de decisiones (C4.5, C4.5p8p12, PART), la regla de la carga neta (considerando también histidina) y un predictor desarrollado según el método matemático SVM (*Support Vector Machine*) (Pillai et al., 2003). Los predictores de Wetcat se diseñaron a partir de una base de datos compuesta por 292 secuencias de V3: 168 secuencias que se corresponden con un fenotipo R5, 103 con un fenotipo X4 y 21 secuencias con fenotipo R5X4, obtenidas desde la base de datos de Los Alamos. Pese a que la página web permite el análisis de multitud de secuencias de aminoácidos de V3 simultáneamente, estas han de estar en un formato muy específico, lo que representa el mayor inconveniente para su uso. Actualmente esta herramienta es muy poco utilizada principalmente por su laboriosa metodología,

aunque también por presentar peor correlación con diferentes ensayos fenotípicos que otros algoritmos de interpretación del tropismo viral (Poveda et al., 2007).

geno2pheno_[coreceptor] (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>). Se desarrolló conjuntamente por la Universidad de Colonia y el Instituto Max-Planck de Alemania (Lengauer et al., 2007), utilizando el método matemático SVM. Dispone de 2 modelos para realizar sus predicciones, uno clonal entrenado a partir de una base de datos con 1100 secuencias de V3 de 332 pacientes naïve y pretratados (769 con fenotipo R5, 210 con fenotipo X4 y 131 con fenotipo dual-mixto, principalmente obtenidas de la base de datos de Los Álamos) y otro modelo clínico entrenado exclusivamente a partir de secuencias V3 de 952 pacientes naïve (779 con fenotipo R5, 172 con fenotipo R5X4 y 1 con fenotipo X4) que permite incorporar la consideración de datos clínicos a la predicción del tropismo viral (carga viral, células T CD4+, porcentaje de células T CD4+, CD8 y genotipo CCR5). Aunque en este grupo de pacientes considerar los datos clínicos mejora marginalmente las predicciones (Sing et al., 2007), el modelo clínico no dispone de tantos trabajos que avalen su fiabilidad como el modelo clonal, por lo que se recomienda utilizar este último. En ambos casos, la mayoría de estas secuencias son de subtipo B, aunque también incluye otros subtipos genéticos. Esta herramienta es la que nos ofrece más facilidades a la hora de importar los datos, pues la importación puede ser de secuencias de nucleótidos o aminoácidos, alineados o no y además, desde marzo de 2011 permite el análisis simultáneo de hasta 50 secuencias V3. Además el predictor de tropismo nos ofrece también el dato de subtipo genético

basado en la región V3. Este método nos permite definir el FPR (*false positive rate*) del análisis, un parámetro que valora la cantidad de virus R5-trópicos que clasificamos erróneamente como X4-trópicos. Cuanto mayor sea el FPR elegido para la interpretación, mayor será la sensibilidad de la herramienta para la detección de virus X4-trópicos, aunque dicho incremento irá acompañado de una pérdida proporcional de especificidad. En la actualidad geno2pheno es uno de algoritmos más populares y utilizados para la determinación genotípica del tropismo viral.

WebPSSM (<http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>). Fue desarrollado por la Universidad de Washington utilizando el método estadístico PSSM (*Position-Specific Scoring Matrix*) (Jensen et al., 2003). Dispone de varias matrices de análisis. Para subtipo B dispone de las matrices R5/X4 y SI/NSI (*Syncytium Inducer/Non-Syncytium Inducer*), mientras que para subtipo C solo dispone de SI/NSI. La matriz R5/X4 de subtipo B se desarrolló con un conjunto de 213 secuencias de V3: 168 con fenotipo R5, 17 fenotipo X4 y 28 con fenotipo R5X4. La matriz SI/NSI de subtipo B se desarrolló a partir de 257 secuencias de V3: 70 con fenotipo SI y 187 con fenotipo NSI. La matriz SI/NSI de subtipo C se desarrolló a partir de 279 secuencias de V3 subtipo C: 228 con fenotipo NSI y 51 con fenotipo SI (Jensen et al., 2006). Este método bioinformático estima la tendencia de las secuencias de aminoácidos de V3 a utilizar el correceptor CXCR4 mediante una matriz de valores. En dicha matriz, las columnas representan cada una de las posiciones de V3, mientras que las filas representan todos los posibles residuos de aminoácidos que se pueden encontrar. Cada secuencia V3

problema tiene asociado una puntuación resultado de la suma de las celdas que le corresponden en la matriz. Los valores umbrales establecidos para la matriz R5/X4 original son -2,88 y -6,96, de modo que aquellas secuencias que puntúen por encima de -2,88 serán clasificadas como X4-trópicas, mientras que las que puntúen por debajo de -6,96 serán clasificadas como R5-trópicas. Para valores intermedios se utiliza la regla 11/25. Para la matriz SI/NSI los valores umbral originales son -1,75 y -5,40, utilizándose también la regla 11/25 para valores intermedios. Este método nos permite analizar hasta 1000 secuencias V3 simultáneamente, que se alinearán automáticamente con una referencia siempre que estén en forma de aminoácidos (Jensen et al., 2003).

Aunque es el ensayo de referencia, el ensayo fenotípico de Trofile® presenta limitaciones técnicas y logísticas que dificultan su utilización en la práctica clínica. En este contexto, los métodos genotípicos, basados en el análisis de la región V3 de la envuelta del VIH, se presentan como una alternativa más económica y factible de realizar en cualquier laboratorio especializado de VIH que cuente con tecnología para realizar estudios genotípicos.

La validación de los ensayos genotípicos para uso clínico ha requerido y requiere de la demostración de su capacidad para identificar pacientes respondedores y no respondedores a un tratamiento con antagonistas de CCR5. Actualmente disponemos de estudios de correlación entre ensayos genotípicos y fenotípicos, así como de estudios retrospectivos en los que se ha evaluado la fiabilidad de estas herramientas para su utilización en la práctica clínica.

La utilización de herramientas genotípicas específicas como geno2pheno y PSSM han demostrado en estudios retrospectivos de los ensayos clínicos MOTIVATE/1029 (McGovern et al., 2010b) y MERIT (McGovern et al., 2010a) su capacidad para identificar pacientes respondedores y no respondedores a un tratamiento con antagonistas de CCR5, a pesar de su menor sensibilidad para detectar variantes X4-trópicas en comparación con Trofile® y ESTA®. Estos datos han puesto de manifiesto la viabilidad de la utilización de métodos genotípicos para la determinación del tropismo viral en la práctica clínica.

OBJETIVOS

La aprobación del primer antagonista de CCR5 (maraviroc) para el tratamiento de la infección por VIH, con actividad específica frente a variantes virales R5-trópicas, ha generado la necesidad de disponer de pruebas para la determinación del tropismo del VIH-1 en la práctica clínica. En los ensayos de registro de maraviroc, la determinación del tropismo del VIH-1 se realizó con el ensayo fenotípico Trofile® (Monogram Biosciences). Esta prueba, a pesar de demostrar su capacidad para seleccionar pacientes respondedores y no respondedores a maraviroc, presenta limitaciones técnicas y logísticas que dificultan su utilización en la práctica clínica.

Los métodos genotípicos, basados en el análisis de la región V3 de la envuelta viral, se presentan como una alternativa más económica, rápida y factible de realizar en cualquier laboratorio especializado de VIH que cuente con tecnología para realizar estudios genotípicos. La implementación del uso de métodos genotípicos para la determinación del tropismo viral en la práctica clínica ha requerido de estudios de concordancia con ensayos fenotípicos, además de evaluaciones respecto su capacidad para identificar pacientes respondedores a antagonistas de CCR5. En este contexto se desarrolló esta tesis con los siguientes objetivos:

1. Evaluación de la concordancia entre métodos genotípicos y fenotípicos para la determinación del tropismo viral en pacientes VIH+ infectados con subtipos B y no-B.
2. Diseño de herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral con una mayor sensibilidad para la detección de variantes X4-trópicas.
3. Caracterización de la dinámica del tropismo viral en pacientes VIH+ en tratamiento antirretroviral con viremia suprimida y evaluación de las alternativas metodológicas para la determinación del tropismo viral en un contexto de viremia indetectable.
4. Validación clínica de las herramientas genotípicas para guiar el uso terapéutico de antagonistas de CCR5 en pacientes VIH+ que inician maraviroc en un contexto de viremia detectable o indetectable.

PACIENTES Y MÉTODOS

2.1. Población de estudio

Los pacientes incluidos en esta tesis son en su mayor parte pacientes VIH-1+ en seguimiento clínico en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III de Madrid. Las características específicas de los pacientes seleccionados se describirán en detalle en cada uno de los estudios que forman parte de esta tesis.

Además, para el estudio 2 de esta tesis se incluyeron pacientes VIH+ que formaron parte del programa de acceso expandido de maraviroc en Europa, así como un grupo de pacientes incluidos en el estudio ALLEGRO (estudio multicéntrico nacional) del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada.

2.2. Recogida de muestras de plasma

Las muestras de plasma se obtuvieron a partir de sangre de los pacientes por punción venosa en tubos Vacutainer con EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) como anticoagulante. El plasma libre de células fue aislado por centrifugación a 800 g durante 10 minutos (min). Las muestras de plasma se almacenaron en alícuotas de 1,5 mL a -20°C hasta su utilización.

2.3. Recogida de células mononucleares de sangre periférica

Las muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se obtuvieron tras la centrifugación de 9 mL de sangre total en gradiente de densidad con 6 mL de Ficoll-

Histopaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). Tras una centrifugación de 30 min a 840 g se separó la fracción del CMSP del resto de componentes. Este aislado linfocitario se resuspendió en 10 mL de tampón fosfato salino (PBS1x, *Phosphate Buffered Saline*. 1000mL. Laboratorios Lonca, Barcelona, España) y se centrifugó nuevamente (472 g durante 5 min).

A continuación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1,5 mL de tampón fosfato salino. Seguidamente, los CMSP se pasaron a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 15.600 g durante 3 min. Por último se eliminó el sobrenadante y se conservó la muestra (pellet seco de CMSP) a -20 °C hasta su utilización.

2.4. Determinación de la carga viral plasmática

La carga viral se determinó en muestras de plasma utilizando el ensayo comercial *Branched DNA Assay Versant 440* (Siemens Medical Solutions, Barcelona, España) con un límite de detección de hasta 50 copias/mL de ARN-VIH, y cuyo rango lineal de medida comprendía de 50 a 500.000 copias/mL de ARN-VIH.

2.5. Recuento de linfocitos T CD4+

El recuento de linfocitos T CD4+ se realizó mediante marcaje directo en sangre total (Beckman-Coulter, Miami, USA). La cuantificación se realizó por citometría de flujo

utilizando el citómetro de flujo FC500 (Coulter Instruments, Miami, USA) y se expresó en forma de cifra absoluta por mm^3 de sangre, así como por porcentaje respecto al total de linfocitos T circulantes.

2.6. Extracción de ARN viral

La extracción de ARN viral se llevó a cabo a partir de 500 μL de plasma utilizando el kit comercial QIA® RNA Blood Mini kit (Quiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido, se eluyó en un volumen final de 60 μL y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

2.7. Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de una alícuota de CMSP conservadas en pellet seco utilizando el kit QIAamp® DNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido, se eluyó en un volumen final de 50 μL , se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

2.8. Análisis genético del gen *pol*

El análisis genotípico de la región *pol*, concretamente de las regiones codificantes para la RT y PR virales se realizó a partir de ARN viral previamente extraído utilizando los

kits comerciales *Viroseq HIV-1 Genotyping System v2.0* (Laboratorios Abbott, Chicago, USA) y *TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit* (Siemens Medical Solutions, Barcelona, España). La interpretación de las resistencias a los antirretrovirales se realizó mediante un sistema de interpretación basado en las Guías de Resistencias a los Antirretrovirales elaborado por los miembros de la plataforma de resistencias de la Red de Investigación en SIDA (RIS) española del año 2011 ([Anexo III](#)).

2.9. Amplificación de la región V3 de la envuelta viral

El análisis genético de la región V3 de la envuelta viral se realizó a partir de muestras de plasma (amplificación desde ARN viral) y CMSP (amplificación desde ADN proviral). La amplificación de la región V3 de la envuelta se realizó por una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada utilizando los kits *AccessQuick® RT-PCR System* (Promega Biotech Ibérica SL, España) y *PCR Master mix* (Promega Biotech Ibérica SL, España). Las características y condiciones de las PCR fueron las siguientes:

PRIMERA PCR (RT-PCR)

Características de los cebadores ([Poveda et al., 2007](#)):

Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Posición en nucleótidos (HXB2)	Sentido	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
E80	CCAATTCCCATACATTATTGTG	6858-6879	<i>Forward</i>	52,1
E105	GCTTTTCCTACTTCCTGCCAC	7502-7522	<i>Reverse</i>	59,7

Mezcla de reacción por muestra	
Reactivo	Cantidad
AccessQuick® Master Mix, 2x	25 µL
Cebador E105 (10 µM)	1 µL
Cebador E80 (10µM)	1 µL
ARN/ADN molde	10 µL
Agua	13 µL
Total	50 µL

Perfil térmico	
Temperatura	Tiempo
48°C	45 min
94°C	2 min
94°C	30 seg
55°C	30 seg
72°C	30 seg
72°C	7 min
4°C	∞

35 ciclos

El amplicón obtenido en la primera PCR (665 pb) fue utilizado como ADN molde en la segunda PCR.

SEGUNDA PCR

Características de los cebadores (Poveda et al., AIDS 2007):

Nombre	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Posición en nucleótidos (HXB2)	Sentido	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
ES7	CTGTAAATGGCAGTCTAGC	7002-7021	<i>Forward</i>	53,1
E125	CAATTCTGGGTCCCCTCCTGAGG	7315-7338	<i>Reverse</i>	68,1

Mezcla de reacción por muestra	
Reactivo	Cantidad
PCR Master Mix, 2x	25 µL
Cebador ES7 (10 µM)	1 µL
Cebador E125 (10µM)	1 µL
ADN molde	5 µL
Agua	18 µL
Total	50 µL

Perfil térmico	
Temperatura	Tiempo
94°C	2 min
94°C	30 seg
55°C	30 seg
72°C	30 seg
72°C	7 min
4°C	∞

35 ciclos

Esta PCR rinde un amplicón de 337 pb. En el caso de que la muestra de partida sea ADN en lugar de ARN el procedimiento es el mismo pero eliminando el paso de RT-PCR.

2.10. Visualización del amplicón y purificación

La presencia de amplicón en el producto de la segunda PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con posterior tinción en bromuro de etidio, visualizando los resultados bajo luz ultravioleta (**figura 10**).

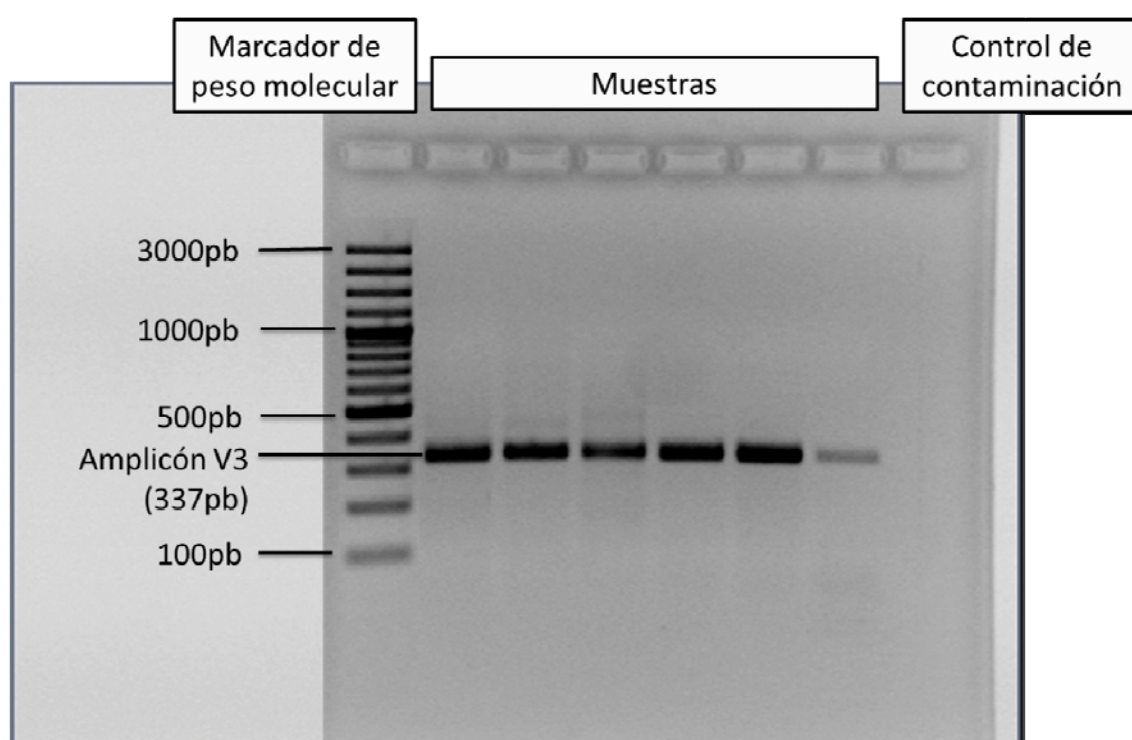


Figura 10. Visualización del amplicón V3 bajo luz UV tras tinción con bromuro de etidio en gel de agarosa al 1% (color invertido).

En el caso de amplificación positiva, el amplicón se purificó utilizando el kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham GE Healthcare Biosciences, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.11. Secuenciación

El producto de PCR purificado fue secuenciado en ambas direcciones utilizando el kit *ABI PRISM dRhodamine Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, USA) en el secuenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Los cebadores utilizados en la reacción de secuencia fueron los mismos que se utilizaron en la segunda PCR, es decir ES7 y E125. En este caso las condiciones de la reacción de secuencia fueron:

Mezcla de reacción	
Reactivo	Cantidad
Rodamina (Premix)	4 µL
DMSO (Di-metil-sulfóxido)	0,5 µL
Cebador ES7 o E125 (3,2 µM)	2 µL
Amplicón purificado	5 µL
Agua	13,5 µL
Total	25 µL

Perfil térmico	
Temperatura	Tiempo
94°C	3 min
96°C	10 seg
50°C	5 seg
60°C	4 min
4°C	∞

25
ciclos

El producto de la reacción de secuencia se procesó utilizando una precipitación basada en NaOH y alcohol, tras la cual se resuspendió en formamida para su posterior análisis en el secuenciador automático ABI PRISM 3100 siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.12. Análisis de secuencias

Todas las secuencias se analizaron con SeqScape® v2.5 (Applied Biosystems), programa que alinea y orienta automáticamente los dos electroferogramas de cada muestra. Se consideró la existencia de mezcla nucleotídica en una posición determinada cuando en el electroferograma el pico secundario alcanzaba al menos el 25% de la altura del pico principal (figura 11).

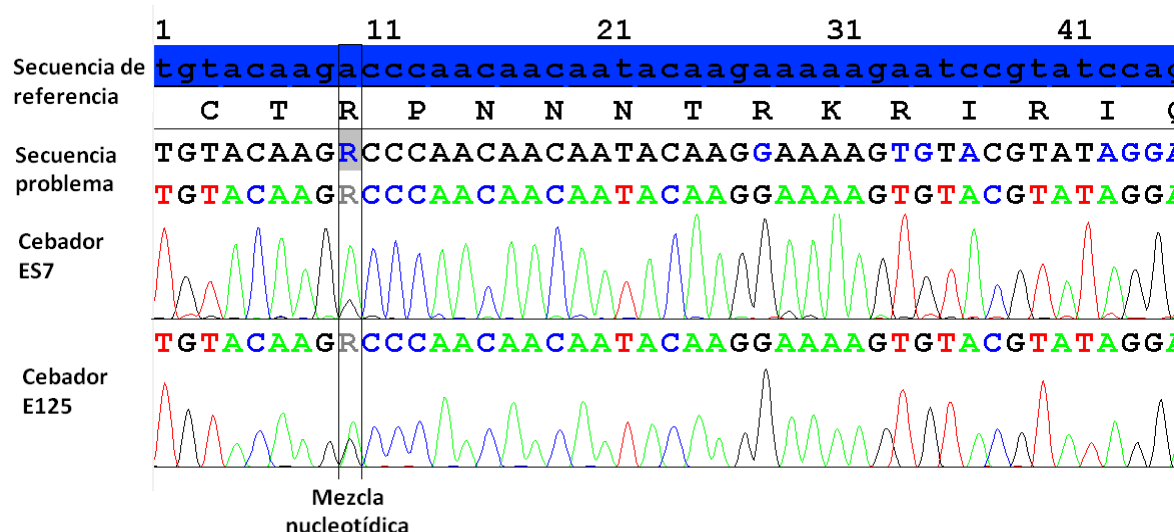


Figura 11. Análisis de secuencias e identificación de mezclas nucleotídicas.

2.13. Interpretación de la secuencia de V3: determinación genotípica del tropismo viral

Las secuencias de nucleótidos de la región V3 se interpretaron utilizando todos los predictores genotípicos descritos en la introducción de esta tesis:

<i>Reglas simples:</i>	11/25, 11/24/25 y Carga neta.
<i>Algoritmos:</i>	Delobel y Garrido.
<i>Predictores complejos:</i>	Wetcat (PART, C4.5, C4.5p8p12, SVM, CHARGERULE), WebPSSM (X4/R5 y SI/NSI) y geno2pheno _[coreceptor] .

En el caso de que la secuencia de V3 obtenida presente mezclas de nucleótidos, se realizó la expansión de la secuencia en todas sus posibles combinaciones de aminoácidos, como paso previo a su posterior interpretación. Esta expansión se pudo realizar automáticamente gracias a la utilización de un programa desarrollado por el informático Gustavo A. Mannuza. Con el fin de aumentar la sensibilidad para la detección de variantes X4-trópicas una muestra fue catalogada como R5 únicamente cuando ninguna de las combinaciones generadas fue catalogada como X4. El empleo de esta estrategia para la interpretación incrementa hasta en un 10% la sensibilidad para la detección de variantes minoritarias X4-trópicas (Chueca et al., 2009). En el caso de que el predictor utilizado para la interpretación del tropismo del VIH sea geno2pheno_[coreceptor], no es necesario realizar esta expansión ya que este predictor realiza automáticamente la expansión y la posterior interpretación de las distintas combinaciones. Independientemente del predictor utilizado se excluyeron todas aquellas secuencias de V3 que tenían más de 8 mezclas nucleotídicas ya que se considera que esta heterogeneidad podría provocar errores de interpretación.

2.14. Determinación fenotípica del tropismo viral

La determinación fenotípica del tropismo viral se llevó a cabo en laboratorios externos utilizando dos ensayos comerciales basados en la generación de virus recombinantes:

Phenoscript® (Viralliance, París, Francia). Para la realización de este ensayo se generó un plásmido recombinante mediante recombinación homóloga entre un amplicón del gen de la envuelta de la muestra problema y un plásmido NL-43 delecionado. Estos plásmidos se introdujeron en células T-293, que fueron las encargadas de producir los virus recombinantes. Con estos virus se infectaron las células indicadoras U373MG-CD4, que expresan CCR5 o CXCR4, además del receptor CD4. Estas células están dotadas del gen lacZ controlado por secuencias virales LTR (*long terminal repeats*), de modo que la producción de beta-galactosidasa actuó como marcador de la infección. La especificidad del ensayo se evaluó mediante la incubación del virus recombinante con células indicadoras en presencia y ausencia de inhibidores de CCR5 o CXCR4. Además se utilizaron como controles 5 muestras virémicas de plasma de distinto tropismo viral e infectividad.

Trofile® (Monogram Biosciences, San Francisco, USA). Este ensayo presenta una serie de particularidades con respecto al anterior. En primer lugar en las células productoras de virus recombinantes (células HEK293, *human embryonic kidney*) se insertan 2 plásmidos en vez de uno solo, uno invariable que carece del gen *env* (sustituido por el gen de la luciferasa, marcador de infección) y otro en el que se clona el gen *env* de la muestra problema. De este modo se generan virus recombinantes que tienen las

proteínas de la envuelta procedentes de la muestra problema, pero que carecen de la información genética para producir virus viables, por lo que ejercen un único ciclo de infección. Con dichos virus recombinantes se infectan células indicadoras (U87CD4+) que expresan CCR5 o CXCR4.

Independientemente del ensayo utilizado, si sólo se produce infección viral en la línea celular que expresa CCR5 el aislado viral es clasificado como R5-trópico. Si la infección se registra exclusivamente en la línea celular que expresa CXCR4 el virus el aislado viral es clasificado como X4-trópico. Si la infección se produce en ambas líneas celulares, el aislado viral se clasifica como de tropismo dual o población mixta. Para la comparación de los datos fenotípicos con los genotípicos, los aislados virales con tropismo dual/población mixta se agruparon con los de tropismo X4-trópico, con el fin de comparar virus R5-trópicos con no R5-trópicos.

2.15. Datos epidemiológicos y marcadores biológicos

Los datos epidemiológicos de los pacientes incluidos en esta tesis fueron género, edad, ruta de transmisión y año de la infección. Los marcadores biológicos utilizados fueron la carga viral del VIH, el recuento de linfocitos T CD4+ y el nadir de linfocitos T CD4+. Otros parámetros analizados incluyeron la exposición antirretroviral previa y la presencia de mutaciones de resistencia a los distintos antirretrovirales.

2.16. Análisis estadístico

Las características basales de las poblaciones de estudio se expresaron como medias (\pm desviación estándar) o medianas [rango intercuartil]. En todos los estudios se comprobó la normalidad en la distribución de las diferentes variables cuantitativas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre los grupos de estudio se analizaron mediante una Chi cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher para variables cualitativas y mediante el test T de Student o el test U de Mann-Whitney para variables cuantitativas, en función de si se trataba de una variable con distribución normal o no, respectivamente. Para las asociaciones entre variables se utilizó de nuevo la Chi cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher para variables cualitativas y los test de correlación de Pearson o Spearman para variables cuantitativas normales y no normales, respectivamente. Para los análisis multivariantes se utilizaron regresiones logísticas binarias en el caso de que la variable de interés fuese cualitativa y regresiones lineales en el caso de que la variable de interés fuese cuantitativa.

En el estudio 2 se utilizó el análisis de curvas ROC para analizar el valor diagnóstico de la herramienta WebPSSM para la detección de virus X4-trópicos. Esta herramienta estadística se utiliza para evaluar la fiabilidad de una prueba diagnóstica y compara la sensibilidad con 1-especificidad del método para todos los valores de umbral posibles. Cuanto mayor sea el área bajo dicha curva, mayor será la fiabilidad del método, permitiéndonos además ajustar el umbral de interpretación a un valor de sensibilidad que consideremos óptimo.

En todos los casos, se consideró estadísticamente significativo valores de “p” por debajo de 0,05. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS v17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

ESTUDIO 1:

**Concordancia entre
herramientas genotípicas y fenotípicas para la
determinación del tropismo del VIH-1**

3.1. Objetivo y diseño del estudio

El objetivo del presente estudio fue evaluar la concordancia entre herramientas genotípicas y fenotípicas para la determinación del tropismo viral en muestras clínicas de pacientes infectados con subtipos B y no-B del VIH-1.

Para ello, se determinó genotípica y fenotípicamente el tropismo viral en un grupo de pacientes VIH+, incluyendo pacientes infectados con diferentes subtipos del VIH-1, con o sin exposición previa a tratamiento antirretroviral. Utilizando los datos fenotípicos como referencia, se caracterizó la concordancia, sensibilidad y especificidad para la detección de variantes X4-trópicas de 13 herramientas genotípicas distintas.

3.2. Pacientes y métodos

3.2.1 Población de estudio

Se seleccionaron pacientes VIH+ en seguimiento clínico regular en el Hospital Carlos III de Madrid durante el periodo comprendido entre Enero de 2001 y Enero de 2009. De los pacientes seleccionados, se recuperaron muestras de plasma almacenadas a -80 °C. Además, algunos pacientes disponían de CMSP aisladas desde la misma muestra de sangre que la alícuota de plasma.

Se recogió información demográfica, carga viral, conteo de células T CD4 y exposición previa a tratamiento antirretroviral en el momento de recogida de las muestras. El subtipo genético viral se determinó mediante el análisis filogenético del gen *pol*.

3.2.2. Determinación genotípica y fenotípica del tropismo viral

Para la determinación genotípica del tropismo viral se amplificó y secuenció la región V3 de la envuelta viral a partir de muestras de plasma y CMSP. La interpretación de dichas secuencias se llevó a cabo utilizando 13 herramientas genotípicas diferentes previamente descritas en el apartado de métodos:

Reglas simples: -11/25, 11/24/25 y Carga neta.

Algoritmos: -Delobel y Garrido.

Predictores complejos: -Wetcat (PART, C4.5, C4.5p8p12, SVM, CHARGERULE)

-WebPSSM (X4/R5 y SI/NSI)

-Geno2pheno_[coreceptor] (*False positive rate:* 1%, 2,5%, 5%, 10%, 15% y 20%)

La determinación fenotípica del tropismo viral se realizó exclusivamente a partir de muestras de plasma utilizando el ensayo Phenoscript® (Viralliance, Paris, Francia).

3.3 Resultados

3.3.1 Características basales de la población de estudio

Inicialmente, se incluyeron en el estudio un total de 198 pacientes con infección por VIH-1, de los cuales 89 pacientes eran naïve a tratamiento antirretroviral y 109 pretratados. El análisis filogenético de la región de la polimerasa del VIH identificó a 83

pacientes con infección por subtipo B y a 115 por subtipos no-B. Todos los pacientes tenían muestra de plasma disponible. Sin embargo, solo 37 pacientes infectados con subtipo B tenían además muestra de CMSP recogida en el mismo momento.

No se pudieron obtener datos de tropismo pareados genotípicos y fenotípicos en todas las muestras inicialmente analizadas debido a fallos en ambos ensayos. En el caso del ensayo fenotípico fundamentalmente se debieron a fallos en la amplificación de la región de la envuelta o en la generación de los virus recombinantes. En el caso de los ensayos genotípicos fueron debidos a problemas con la amplificación de la región V3 o a la obtención de secuencias de baja calidad. En concreto, se obtuvieron resultados fenotípicos del tropismo viral en 165 muestras de plasma (83%), 78 procedentes de pacientes infectados con subtipo B y 87 infectados con subtipos no-B. En cuanto a los resultados genotípicos, estos se obtuvieron en un total de 176 muestras de plasma (89%), 83 de pacientes infectados con subtipo B y 93 con subtipos no-B. No existieron diferencias estadísticamente significativas en la obtención de resultados genotípicos o fenotípicos respecto al subtipo viral.

En cuanto a las 37 muestras de CMSP, se obtuvo dato genotípico en 32 muestras, todas ellas con dato fenotípico pareado derivado de las muestras de plasma.

En resumen, se obtuvieron datos de tropismo pareados genotípicos y fenotípicos para 150/198 (76%) muestras de plasma y 32/37 (86%) muestras de CMSP.

De los 150 pacientes en los que se realizaron los análisis finales por disponer de datos de tropismo genotípicos y fenotípicos pareados, 75 estaban infectados con subtipo B y

75 con subtipos no-B. La distribución de los subtipos no-B fue la siguiente: 21 CRF_02, 16 G, 8 C, 5 A, 4 CRF_01, 4 CRF_12, 3 D, 3 F, 2 CRF_14, 2 J, 1 CRF_11, 1 H y 5 URF (*Unique Recombinant Forms*). En la **tabla 3**, se representan las principales características de la población de estudio. En total, 69 (46%) pacientes eran naïve, mientras que 81 (54%) eran pacientes en fracaso virológico previamente expuestos a tratamiento antirretroviral durante una media de 6,82 ($\pm 2,94$) años. La carga viral fue de 4,28 ($\pm 0,79$) log VIH-ARN copias/mL, mientras que el conteo de células T CD4 fue de 330 (± 259) cel/mm³. Los pacientes pretratados tenían niveles de células T CD4 ligeramente menores que los pacientes naïve, aunque la carga viral era similar. Del mismo modo, los pacientes infectados con subtipos no-B tenían una carga viral ligeramente mayor que los infectados con subtipo B, aunque los niveles de células T CD4 eran similares. La proporción de pacientes pretratados fue similar entre pacientes infectados con subtipo B en comparación con aquellos infectados con subtipos no-B (59% vs. 49%, $p > 0,1$).

De acuerdo con los datos fenotípicos, el 20% ($n=30$) de los aislados virales procedentes de muestras de plasma fueron clasificados como X4-trópicos. Los pacientes infectados con virus X4-trópicos presentaban menores conteos de células T CD4 que aquellos infectados con virus R5-trópicos (221 (± 191) vs. 358 (± 267) cel/mm³, $p=0,01$), con valores de carga viral similares (4,37 ($\pm 0,80$) vs. 4,26 ($\pm 0,79$) log copias/mL, $p > 0,1$).

	Tratamiento			Subtipo viral		
	Naïve (n=69)	Pretratados (n=81)	p	B (n=75)	No-B (n=75)	p
CD4 basales (cel/mm ³)	394 ±320	282 ±189	0,031	323 ±300	336 ±218	NS
Carga viral (log copias/mL)	4,41 ±0,77	4,18 ±0,80	NS	4,12 ±0,72	4,44 ±0,83	0,002

Tabla 3. Carga viral y conteo de células CD4 en población de estudio respecto exposición previa a tratamiento y subtipo genético viral.

No se observaron diferencias significativas en la distribución de los virus X4-trópicos, ni al comparar pacientes naïve con pretratados (14,5% vs. 24,7%, $p>0,1$) ni al comparar pacientes infectados con subtipo B frente a aquellos infectados con subtipos no-B (24% vs. 16%, $p>0,1$).

3.3.2. Características de las secuencias V3

Entre las 150 secuencias V3 derivadas de las muestras de plasma (números de acceso de *Genbank*: GU265234-GU265383) con dato fenotípico pareado, se observaron mezclas de nucleótidos en el 69,3% ($n=104$) de ellas. La proporción de secuencias V3 con mezclas fue similar en pacientes naïve y pretratados (66,7% vs. 71,6%, $p>0,1$) así como en aquellos infectados con subtipos B comparados con los infectados con subtipos no-B (76% vs. 62,7%, $p>0,1$).

La longitud de las secuencias varió entre 34 y 38 aminoácidos. La mayoría tenían 35 aminoácidos (80%), seguidas por aquellas con 34 (15,3%), 36 (2%), 38 (2%) y 37 (0,7%). De las 32 secuencias derivadas de CMSP (números de acceso de Genbank: GU265202-GU265233) un 53% (n=17) presentaban mezclas nucleotídicas. La mayoría de las secuencias contenían 35 aminoácidos (71,9%), seguidas de las secuencias con 34 (25%) y 38 (3,1%).

3.3.3. Correlación entre los resultados genotípicos y fenotípicos en muestras de plasma

En población general, la concordancia entre los resultados de Phenoscript® y los predictores genotípicos varió de un 63% a un 85%, en función de la herramienta evaluada (**Tabla 4**).

En población general, la concordancia superó el 80% en muchos predictores genotípicos, tales como Wetcat_{C4.5} (81%), Wetcat_{C4.5p8p12} (81%), el algoritmo de Delobel (82%), la regla 11/25 (83%), la regla 11/24/25 (83%), Wetcat_{CHARGERULE} (83%), WebPSSM_{SI/NSI} (83%), Geno2pheno_{FPR=2,5%} (83%) y WebPSSM_{X4/R5} (85%). En general, los valores de sensibilidad para la detección de virus X4-trópicos fueron menores (promedio: 63%) en comparación con los valores de especificidad, que alcanzaban el 90% en la muchos casos. Los mejores resultados respecto a sensibilidad/especificidad se consiguieron con el algoritmo de Garrido (80%/79%), WebPSSM_{X4/R5} (77%/87%) y Geno2pheno_{FPR=5%} (80%/77%).

	Método	Población total (n=150)			Subtipo B (n=75)		Subtipos no-B (n=75)		Naïve (n=69)		Pretratados (n=81)		B pretratados (n=44)	
		Conc(%)	Sens(%)	Esp(%)	Sens(%)	Esp(%)	Sens(%)	Esp(%)	Sens(%)	Esp(%)	Sens(%)	Esp(%)	Sens(%)	Esp(%)
Reglas simples	11/25	83	57	89	72	86	33	92	30	93	70	85	85	77
	11/24/25	83	60	89	78	86	33	92	30	93	75	85	92	77
	Carga Neta	79	70	81	78	75	58	86	60	80	75	82	85	74
	Delobel	82	47	91	56	88	33	94	20	95	60	87	69	77
	Garrido	79	80	79	94	74	58	84	70	78	85	80	100	74
Wetcat	C4.5	81	30	93	33	96	25	90	20	93	35	93	38	97
	C4.5p8p12	81	27	95	28	96	25	94	20	92	30	98	31	100
	PART	75	60	79	78	68	33	89	30	85	75	74	92	58
	SVM	69	73	68	94	54	42	79	70	69	75	66	92	45
	CHARGERULE	83	57	89	78	84	25	94	40	92	65	87	85	77
WebPSSM	X4/R5	85	77	87	89	86	58	87	70	88	80	85	92	77
	SI/NSI	83	73	86	89	81	50	90	50	88	85	84	100	74
Geno2pheno	FPR=1%	79	23	93	28	91	17	94	30	95	20	90	23	84
	FPR=2,5%	83	70	86	83	79	50	92	50	93	80	79	92	65
	FPR=5%	77	80	77	94	68	58	84	70	80	85	74	100	55
	FPR=10%	69	80	66	94	51	58	79	70	64	85	67	100	42
	FPR=15%	68	83	64	94	49	67	78	80	63	85	66	100	42
	FPR=20%	63	83	58	94	46	67	70	80	56	85	61	100	39

Conc: concordancia; Sens: sensibilidad; Esp: especificidad. Los valores por encima de 70% están destacados en negrita.

Tabla 4. Concordancia, sensibilidad y especificidad de las herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral tomando como referencia el ensayo fenotípico *Phenoscript*® en población general y respecto a exposición previa a terapia antirretroviral y subtipo genético.

Los resultados fueron en general mejores para los pacientes infectados con subtipo B en comparación con aquellos infectados con subtipos no-B (promedio: 75% vs. 44%). En pacientes infectados con subtipo B (n=75), los mejores valores de sensibilidad/especificidad se obtuvieron con WebPSSM_{X4/R5} (89%/86%), WebPSSM_{SI/NSI} (89%/81%) y el algoritmo de Garrido (94%/74%). La sensibilidad fue en general menor para subtipos no-B (rango: 17%-67%).

Del mismo modo, se obtuvieron mejores resultados de sensibilidad y especificidad para la mayoría de predictores genotípicos cuando se analizaron pacientes pretratados en comparación con pacientes naïve. La sensibilidad para la detección de virus X4-trópicos fue mayor para pacientes pretratados en comparación con los naïve utilizando cualquiera de los predictores genotípicos (promedio: 69% vs. 49%), excepto para geno2pheno_{FPR=1%}. En el grupo de pacientes pretratados los mejores resultados de sensibilidad se obtuvieron con WebPSSM_{SI/NSI} (85%/84%), WebPSSM_{X4/R5} (80%/85%), geno2pheno_{FPR=5%} (85%/74%) y el algoritmo de Garrido (85%/80%). Para pacientes naïve la sensibilidad fue en general menor, siendo los mejores predictores WebPSSM_{X4/R5} (70%/88%) y geno2pheno_{FPR=5%} (70%/80%).

Así, en el grupo de pacientes pretratados infectados con subtipo B (n=44) se observaron los mejores resultados, donde algunos algoritmos como el de Garrido o WebPSSM_{SI/NSI} detectaron el 100% de los virus X4-trópicos manteniendo elevados valores de especificidad (74%).

3.3.4. Correlación entre los resultados genotípicos en CMSP y fenotípicos en plasma

En el subgrupo de 37 pacientes infectados con subtipo B de los que se disponía de muestra de CMSP y plasma pareada se obtuvieron 32 resultados de tropismo pareados fenotípico en plasma y genotípico en CMSP. De ellos, 22 (69%) habían estado previamente expuestos a terapia antirretroviral y 9 (28%) estaban infectados con variantes X4-trópicas del VIH-1, según datos fenotípicos.

En general los resultados fenotípicos de Phenoscript® derivados de muestras de plasma se correlacionaron mejor con las predicciones genotípicas basadas en secuencias derivadas de CMSP en comparación con las derivadas de muestras de plasma (**Tabla 5**). La concordancia y la especificidad para la detección de virus X4-trópicos fue mejor para todos los métodos genotípicos analizados en muestras de CMSP que en las de plasma, excepto para Wetcat_{C4.5p8p12} que presentaba valores idénticos. El promedio de concordancia en muestras de CMSP fue del 80%, en comparación con el 68% en muestras de plasma. Para la especificidad, el promedio en muestras de CMSP fue del 81% y en muestras de plasma del 65%. La sensibilidad fue mayor en CMSP que en plasma para las reglas 11/25 y 11/24/25, Wetcat_{CHARGERULE}, WebPSSM_{SI/NSI} y geno2pheno_{FPR=2,5%}; menor para la regla de la carga neta y Wetcat_{SVM}; e idéntica para el resto de herramientas genotípicas analizadas. Es destacable el caso de WebPSSM_{SI/NSI}, cuyos valores de concordancia, sensibilidad y especificidad fueron 72%, 78% y 70% en plasma, mientras que en CMSP se incrementaron a 88%, 89% y 87%, respectivamente.

Plasma (n=32)				CMSP (n=32)		
Conc(%)	Sens(%)	Esp(%)		Conc(%)	Sens(%)	Esp(%)
72	67	74	11/25	84	78	87
75	78	74	11/24/25	88	89	87
69	78	65	Carga Neta	78	67	83
69	56	74	Delobel	81	56	91
72	89	65	Garrido	81	89	78
84	56	96	Wetcat _{C4.5}	88	56	100
84	44	100	Wetcat _{C4.5p8p12}	84	44	100
59	78	52	Wetcat _{PART}	72	78	70
56	100	39	Wetcat _{SVM}	75	89	70
72	67	74	Wetcat _{CHARGERULE}	84	78	87
78	89	74	WebPSSM _{X4/R5}	88	89	87
72	78	70	WebPSSM _{SI/NSI}	88	89	87
72	44	83	Geno2pheno _{FPR=1%}	78	44	91
69	78	65	Geno2pheno _{FPR=2,5%}	81	89	78
63	89	52	Geno2pheno _{FPR=5%}	78	89	74
56	89	43	Geno2pheno _{FPR=10%}	72	89	65
56	89	43	Geno2pheno _{FPR=15%}	72	89	65
50	89	35	Geno2pheno _{FPR=20%}	69	89	61

Conc: Concordancia; Sens: Sensibilidad; Esp: Especificidad. Los valores por encima del 70% están resaltados en negrita.

Tabla 5. Concordancia, sensibilidad y especificidad de las herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral en muestras de plasma (ARN viral) y CMSP (ADN proviral) tomando como referencia el ensayo fenotípico Phenoscript®.

3.4. Discusión

Desde la aprobación de maraviroc en agosto de 2007, el desarrollo de métodos para la determinación del tropismo viral en muestras clínicas ha adquirido especial relevancia. Aunque los ensayos fenotípicos se consideraron inicialmente como los métodos más fiables para la determinación del tropismo viral, se trata de métodos muy complejos, costosos y que requieren instalaciones y personal especializados para su realización. Los ensayos genotípicos se presentan como una alternativa más sencilla, rápida, económica y fácil de implementar en laboratorios ya habilitados para la realización de test de resistencias a antirretrovirales. Sin embargo, la fiabilidad de estos predictores genotípicos ha de ser evaluada antes de su implementación en la práctica clínica.

La mayoría de estudios comparativos entre métodos genotípicos y fenotípicos para la determinación del tropismo viral coinciden en altos valores de especificidad para la detección de variantes X4-trópicas para las herramientas genotípicas, con valores que oscilan del 80 al 90% (Low et al., 2007; Poveda et al., 2007; Raymond et al., 2008). Sin embargo, mientras la sensibilidad es baja en algunos estudios (22-45%; Low et al., 2007), otros trabajos han observado valores más altos (de hasta el 89%), dependiendo de la población de pacientes analizada, el ensayo fenotípico empleado como referencia y/o los algoritmos genotípicos analizados (Poveda et al., 2007, Raymond et al., 2008). Además, algunos algoritmos han adoptado mejoras o se han combinado entre ellos aumentando así su capacidad predictora (Delobel et al., 2007; Chueca et al., 2009, Poveda et al., 2009). Más importante aún, análisis retrospectivos de los ensayos

clínicos de maraviroc han informado de una eficacia similar entre algunas herramientas genotípicas como geno2pheno_{FPR=5%/5,75%} o WebPSSM_{X4/R5} y el ensayo fenotípico Trofile® para predecir respuesta clínica a maraviroc (McGovern et al., 2010a; McGovern et al., 2010b).

El presente estudio ha evaluado la fiabilidad de varias herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral en un grupo de 198 pacientes infectados por VIH-1, incluyendo pacientes naïve y pretratados infectados con diferentes subtipos virales tomando como referencia los resultados del ensayo fenotípico Phenoscript®. Los datos reflejan que algunas herramientas como WebPSSM y geno2pheno_[coreceptor] tienen una mayor fiabilidad que otras como Wetcat_{SVM} o las reglas simples 11/25 u 11/24/25, tanto en términos de concordancia como de sensibilidad y especificidad para la detección de variantes X4-trópicas. Además, la combinación de herramientas como en el caso del algoritmo de Garrido (11/25 + carga neta) rinde buenos resultados, siendo una buena estrategia a seguir para mejorar los sistemas de interpretación de tropismo viral. En general, la sensibilidad y especificidad varió dependiendo de la herramienta genotípica utilizada, obteniendo los mejores resultados para WebPSSM_{X4/R5} (77%/87%), geno2pheno_{FPR=5%} (80%/77%) y el algoritmo de Garrido (80%/79%) en población general. Es importante destacar que los valores de concordancia obtenidos entre Phenoscript® y algunos métodos genotípicos como WebPSSM_{X4/R5} (85%) o geno2pheno_{FPR=2,5%} (83%) en población general son similares a los obtenidos al comparar los métodos fenotípicos Phenoscript® y Trofile®, siendo este último el único

ensayo prospectivamente validado para el cribado de pacientes candidatos a iniciar una terapia con maraviroc ([Skrabal et al. 2007](#)).

Además, las herramientas genotípicas parecen comportarse mejor en pacientes infectados con subtipo B que con subtipos no-B, así como en pacientes pretratados que en naïve. Los mejores valores de sensibilidad se obtuvieron al analizar pacientes pretratados infectados con subtipo B, donde algunas herramientas genotípicas alcanzaron el 100% (algoritmo de Garrido, WebPSSM_{SI/NSI} y geno2pheno_{FPR=5%}). Estos resultados confirman otros obtenidos en estudios anteriores ([Garrido et al., 2008](#)) y pueden justificarse por la mayor proporción de secuencias V3 derivadas de pacientes pretratados infectados con subtipo B que componen las bases de datos a partir de las cuales se han desarrollado los predictores complejos de determinación del tropismo viral. En todo caso, estos datos son especialmente alentadores si tenemos en cuenta que maraviroc sólo está indicado en Europa para el tratamiento de pacientes pretratados con tropismo R5-trópico.

Cabe destacar que, pese al peor comportamiento de las herramientas para la determinación del tropismo viral en pacientes infectados con subtipos no-B, la herramienta que ha aportado los mejores valores de sensibilidad para la detección de variantes X4-trópicas (67%) es geno2pheno_[coreceptor]. Este resultado puede estar justificado por la inclusión de una proporción considerable de secuencias V3 derivadas de pacientes infectados con subtipos no-B en la base de datos a partir de la cual se ha desarrollado. Pese a que Wetcat también incluye secuencias V3 derivadas de pacientes infectados con subtipos no-B, los resultados son mejores para geno2pheno_[coreceptor].

posiblemente por el mayor número global de casos incluidos en la base de datos a partir de la cual se ha desarrollado (1110 en geno2pheno y 292 en Wetcat).

Respecto al tipo de muestra utilizada para la determinación del tropismo genotípico se obtuvieron mejores resultados cuando se analizó a partir de CMSP respecto que cuándo se utilizó plasma. Lo esperable era que existiese una mayor correlación entre las predicciones genotípicas del tropismo viral derivadas de muestras de plasma y los datos fenotípicos derivados del mismo tipo de muestra. Sin embargo, la concordancia, especificidad y en muchos casos también la sensibilidad de las herramientas genotípicas para la detección de variantes X4-trópicas fue mayor a partir de muestras de CMSP. La mayor sensibilidad de los ensayos fenotípicos como Phenoscript® para la detección de variantes X4-trópicas podría verse compensada en parte por las herramientas genotípicas si se parte de muestras de CMSP respecto a muestras de plasma, pues en las primeras algunos autores han observado una mayor prevalencia de virus X4-trópicos ([Verhofstede et al., 2009](#)). En cualquier caso, estos resultados han de ser interpretados con cautela, pues el escaso número de casos analizados en este subanálisis así como el empleo de Phenoscript® en lugar de Trofile® como ensayo fenotípico de referencia limita la obtención de resultados concluyentes.

La potencial aplicabilidad de las herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral en muestras de CMSP puede ser de especial utilidad cuando se considera la utilización de maraviroc en terapias de intensificación o simplificación, situaciones en las que la ausencia de viremia detectable impide la utilización de muestras de plasma para la realización de ensayos fenotípicos de tropismo viral.

En conclusión, las herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral presentan un mejor comportamiento para ciertos grupos de pacientes: aquellos infectados con subtipo B, frente a los infectados con subtipos no-B; así como para los pacientes con experiencia antirretroviral previa, frente a aquellos naïve a tratamiento. Sin embargo, no todas las herramientas genotípicas presentan la misma fiabilidad. Uno de los mejores predictores en términos de sensibilidad y especificidad para la detección de variantes X4-trópicas fue WebPSSM_{X4/R5}, herramienta que alcanzó una concordancia similar a la alcanzada entre los métodos fenotípicos Phenoscript® y Trofile® (Skrabal et al., 2007). Además, aun teniendo en cuenta el limitado número de pacientes analizados y el ensayo fenotípico de referencia, todos los predictores genotípicos brindaron mejores resultados en muestras de CMSP (ADN proviral) que en muestras de plasma (ARN viral). Aunque son necesarios más estudios en esta línea, este dato es de especial interés para la determinación del tropismo viral en pacientes con viremia indetectable en los que se esté considerando utilizar maraviroc como parte de una terapia de simplificación o intensificación.

Los resultados obtenidos en este estudio han sido publicados en “*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*” en Abril de 2010 (Anexo II).

Referencia: Eduardo Seclén, Carolina Garrido, María del Mar González, Juan González-Lahoz, Carmen de Mendoza, Vicente Soriano y Eva Poveda. **High sensitivity of specific genotypic tools for detection of X4 variants in antiretroviral-experienced patients**

suitable to be treated with CCR5 antagonists. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010; 65(7): 1486-1492.

ESTUDIO 2:

**Optimización de una herramienta
genotípica para la determinación del
tropismo viral en la práctica clínica**

4.1. Diseño y objetivo del estudio

El objetivo del presente estudio fue la optimización de una herramienta genotípica para la determinación del tropismo viral en la práctica clínica.

Para ello, se determinó el tropismo viral utilizando diferentes herramientas genotípicas y el ensayo fenotípico Trofile® (Monogram Biosciences, California, USA) en pacientes infectados por VIH-1 incluidos en el programa de acceso expandido en Europa del antagonista de CCR5 maraviroc. En los ensayos de aprobación y registro de maraviroc, la determinación del tropismo del VIH se realizó con el ensayo de Trofile®. Este ensayo ha demostrado de forma prospectiva su capacidad para identificar pacientes respondedores y no respondedores a una terapia con maraviroc. En base a los datos obtenidos tras evaluar la concordancia entre las distintas herramientas genotípicas y Trofile® se optimizaron los umbrales de interpretación de la herramienta genotípica WebPSSM. La eficacia de las nuevas herramientas optimizadas se validó en una cohorte independiente de pacientes procedente del ensayo ALLEGRO, de los que también se disponía de dato de tropismo viral pareado genotípico y de Trofile®.

4.2 Pacientes y métodos

4.2.1 Población de estudio

El estudio se llevó a cabo en muestras de dos poblaciones de estudio diferentes.

La primera estaba compuesta por 266 pacientes infectados por VIH-1 que formaron parte del programa de acceso expandido de maraviroc en Europa. Entre los criterios de

inclusión para este programa figuraban: tener más de 16 años, estar en fracaso antirretroviral, tener carga viral por encima de las 1000 copias ARN-VIH/mL y tener mutaciones de resistencia documentadas a 2 o más familias de antirretrovirales. El tropismo viral se determinó en muestras de plasma recogidas antes del inicio del tratamiento utilizando el ensayo fenotípico de Trofile®. En las mismas muestras de plasma se amplificó la región V3 para la determinación genotípica del tropismo viral en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Carlos III de Madrid.

El segundo grupo estaba compuesto por 118 pacientes infectados por VIH incluidos en el estudio ALLEGRO, un estudio multicéntrico llevado a cabo durante 2007 cuyo objetivo fue el de evaluar la prevalencia de virus R5-trópicos en pacientes infectados por VIH-1 y con exposición previa a terapia antirretroviral en España. Entre los criterios de inclusión del ensayo figuraba estar en fracaso virológico y tener carga viral por encima de las 1000 copias ARN-VIH/mL. Se recogieron muestras de plasma en el momento del fracaso terapéutico que se enviaron a San Francisco para la realización del ensayo de Trofile®. En paralelo, se determinó el tropismo viral genotípicamente utilizando las mismas muestras de plasma.

4.2.2 Determinación genotípica del tropismo viral

Para la determinación genotípica del tropismo viral se amplificó, secuenció e interpretó la región V3 viral desde muestras de plasma tal y como se ha explicado anteriormente. Los métodos genotípicos empleados fueron:

Reglas simples: -11/25, 11/24/25

Predictores complejos: -Wetcat (PART, C4.5, C4.5p8p12, SVM, CHARGERULE)

-WebPSSM (X4/R5 y SI/NSI)

-Geno2pheno_[coreceptor] (*False positive rate:* 1%, 2,5%, 5%, 10%, 15% y 20%)

WebPSSM es un método bioinformático que estima la tendencia de las secuencias de aminoácidos de V3 a utilizar el correceptor CXCR4 mediante una matriz de valores. En dicha matriz, las columnas representan cada una de las posiciones de V3, mientras que las filas representan todos los posibles residuos de aminoácidos que se pueden encontrar. Cada secuencia V3 problema tiene asociado una puntuación resultado de la suma de las celdas que le corresponden en la matriz. Los valores umbrales establecidos para la matriz R5/X4 original son -2,88 y -6,96, de modo que aquellas secuencias que puntúen por encima de -2,88 serán clasificadas como X4-trópicas, mientras que las que puntúen por debajo de -6,96 serán clasificadas como R5-trópicas. Para valores intermedios se utiliza la regla 11/25. Para la matriz SI/NSI los valores umbral originales son -1,75 y -5,40, utilizándose también la regla 11/25 para valores intermedios.

4.3 Resultados

4.3.1 Concordancia entre las herramientas genotípicas y Trofile®

Se analizaron un total de 266 muestras de plasma del grupo de pacientes al acceso expandido de maraviroc en Europa. Mientras que con el ensayo fenotípico de Trofile® se obtuvieron resultados de tropismo para 220 muestras (82,7%), utilizando métodos genotípicos se consiguió amplificar e interpretar la región V3 en 246 muestras (92,5%). Se obtuvieron datos pareados para 202 muestras, en las que la concordancia entre las herramientas genotípicas y el Trofile® osciló del 64% al 80% (**Tabla 6**). Pese a la elevada especificidad registrada para la mayoría de los métodos analizados (del 58% al 95%), la sensibilidad fue en general baja, alcanzando un máximo de 76%.

	Conc. (%)	Sens. (%)	Esp. (%)
11/25	75	53	86
11/24/25	75	55	84
Wetcat _{C4.5}	76	36	95
Wetcat _{C4.5p8p12}	76	36	95
Wetcat _{PART}	75	44	89
Wetcat _{SVM}	68	58	73
Wetcat _{CHARGERULE}	74	50	86
WebPSSM _{X4/R5}	80	59	89
WebPSSM _{SI/NSI}	79	61	87
Geno2pheno _{FPR=1%}	75	32	95
Geno2pheno _{FPR=5%}	76	59	84
Geno2pheno _{FPR=10%}	69	65	71
Geno2pheno _{FPR=15%}	66	71	63
Geno2pheno _{FPR=20%}	64	76	58

Los valores >70% están resaltados en negrita. Conc: Concordancia, Sens: Sensibilidad, Esp: Especificidad.

Tabla 6. Concordancia, sensibilidad y especificidad de las herramientas genotípicas tomando como referencia el ensayo fenotípico Trofile®.

Los resultados discordantes entre los métodos genotípicos y Trofile® no fueron atribuibles al subtipo genético ya que solo 2 individuos de la población de estudio estaban infectados con subtipos no-B: uno con subtipo F y otro con subtipo D. En cuanto al individuo infectado con subtipo F las pruebas genotípicas y fenotípicas coincidían en un tropismo R5-trópico, mientras que para el individuo infectado por subtipo D las predicciones genotípicas y de Trofile® fueron diferentes.

4.3.2. Optimización del umbral de WebPSSM_{X4/R5} y WebPSSM_{SI/NSI} para la detección de virus X4-trópicos

De las herramientas genotípicas evaluadas en este estudio, WebPSSM_{X4/R5} y WebPSSM_{SI/NSI} fueron las 2 que mejores resultados brindaron tanto en términos de concordancia como de sensibilidad y especificidad. La herramienta WebPSSM_{X4/R5} presentó una concordancia del 80%, una sensibilidad para la detección de virus X4-trópicos del 59%, mientras que sus valores de especificidad correspondieron al 89%. En el caso de WebPSSM_{SI/NSI} estos valores fueron 79% de concordancia, 61% de sensibilidad y 87% de especificidad.

Se realizaron curvas de análisis ROC para definir el punto óptimo de corte a partir del cual se aumentase la sensibilidad para la detección de los virus X4-trópicos sin una pérdida excesiva de especificidad para ambas matrices (X4/R5 y SI/NSI). Una curva ROC es una representación gráfica de la sensibilidad frente a (1 – especificidad) para un sistema clasificador binario según se varía el umbral de discriminación. Así,

independientemente del valor seleccionado como umbral, cuanto mayor sea el área total bajo la curva, más robusto será el sistema de predicción.

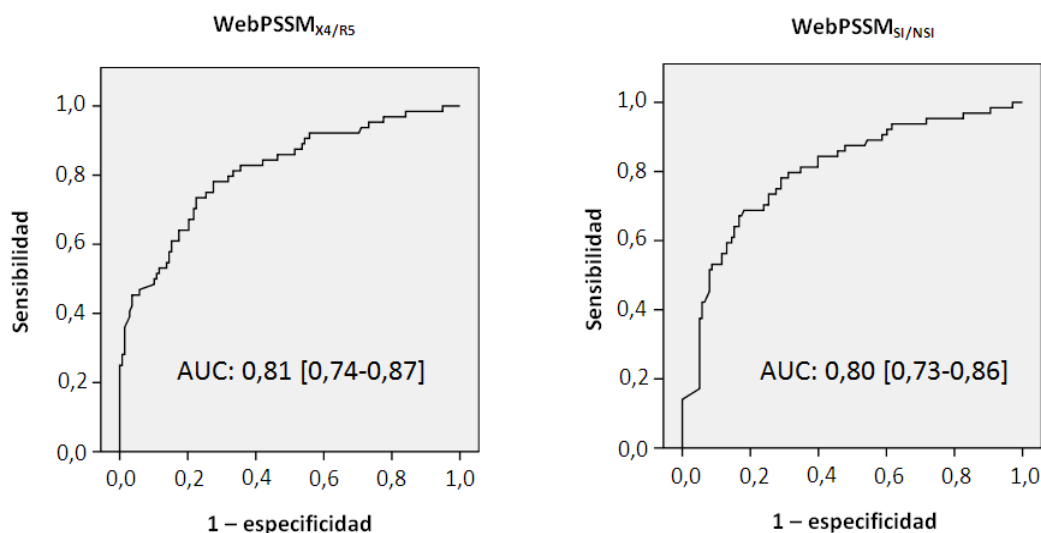


figura 12. Curvas ROC para los métodos WebPSSM_{X4/R5} y WebPSSM_{SI/NSI} tomando como referencia los resultados de Trofile®.

El área bajo la curva (AUC: *area under the curve*) para la matriz WebPSSM_{X4/R5} fue de 0,81 (IC95%: 0,74-0,87), mientras que para WebPSSM_{SI/NSI} fue de 0,80 (IC95%: 0,73-0,86); ambos valores propios de un algoritmo de predicción fiable (**Figura 12**). Con estos datos, en el caso de la matriz WebPSSM_{X4/R5} el valor optimizado de corte se fijó en -8, que mostraba una sensibilidad del 81% con una especificidad del 68% para la detección de virus X4-trópicos para este grupo de pacientes. En el caso de WebPSSM_{SI/NSI} el valor de corte optimizado se fijó en -6,4, que daba lugar a una sensibilidad del 84% con una especificidad del 57% (**tabla 7**). Los algoritmos WebPSSM_{X4/R5} y WebPSSM_{SI/NSI} con los nuevos puntos de corte fueron renombrados como WebPSSM_{X4/R5-8} y WebPSSM_{SI/NSI-6,4}. Utilizando estos nuevos algoritmos, aquellas

muestras con una puntuación por encima del nuevo umbral de interpretación (-8 ó -6,4) se clasificaban como X4-trópicas, mientras que si el valor era igual o inferior se clasificaban como R5-trópicas.

	Concordancia (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
WebPSSM _{X4/R5-8}	72	81	68	54	89
WebPSSM _{SI/NSI-6,4}	66	84	57	48	89

Tabla 7. Valores de concordancia de los algoritmos optimizados WebPSSM_{X4/R5-8} y WebPSSM_{SI/NSI-6,4} en la cohorte de diseño (n=202).

4.3.3. Validación de WebPSSM_{X4/R5-8} y WebPSSM_{SI/NSI-6,4}

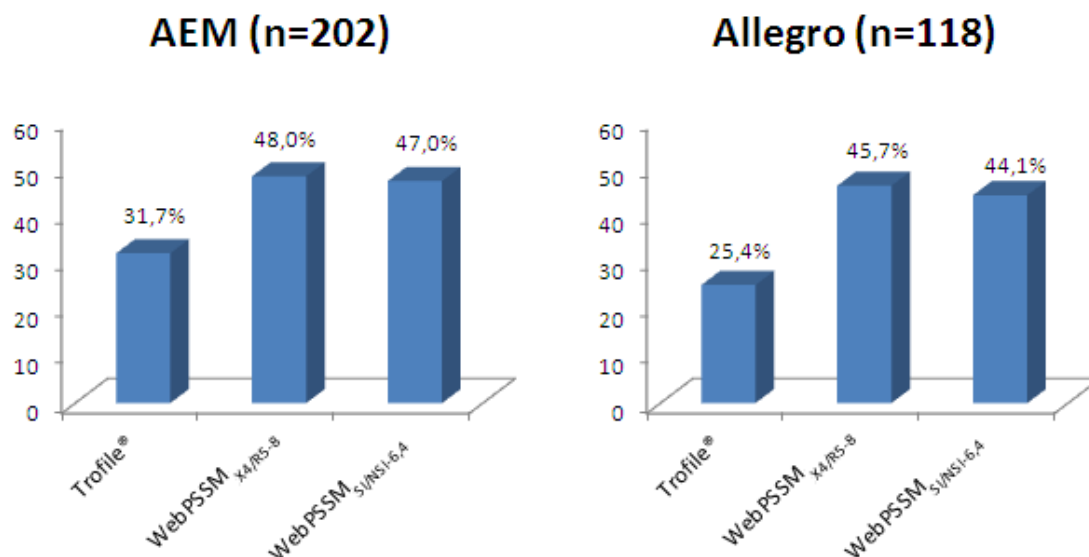
La fiabilidad de estos nuevos umbrales de interpretación para WebPSSM se evaluó en un grupo independiente de 148 pacientes VIH-1 positivos incluidos en el estudio ALLEGRO, de los que se disponía de dato genotípico y de Trofile® pareado del tropismo viral. En el momento de la determinación del tropismo viral, los sujetos tenían una mediana de carga viral de 4,2 [4,04-4,66] log copias ARN-VIH/mL, y una mediana de células CD4 de 269 [148-362] células/mm³. Se obtuvieron datos fenotípicos y genotípicos pareados de 118 muestras. En este grupo de pacientes, la concordancia de Trofile® con WebPSSM_{X4/R5-8} y WebPSSM_{SI/NSI-6,4} fue del 75% y 76%, respectivamente. La sensibilidad para la detección de virus X4-trópicos alcanzó el 93% para WebPSSM_{X4/R5-8} con una especificidad del 69%, un valor predictivo negativo del 97% y un valor predictivo positivo del 49%. En el caso de WebPSSM_{SI/NSI-6,4} la sensibilidad fue del 93%, con una especificidad del 71%, un valor predictivo negativo del 97% y un valor predictivo positivo del 51% (tabla 8).

	Concordancia (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
WebPSSM _{X4/R5-8}	75	93	69	49	97
WebPSSM _{SI/NSI-6,4}	76	93	71	51	97

Tabla 8. Valores de concordancia de los algoritmos optimizados en cohorte de validación (n=118).

4.3.4. Prevalencia de virus X4-trópicos por Trofile® y herramientas genotípicas

La tasa de virus X4-trópicos en la población de pacientes VIH-1 positivos pretratados con resistencia a 2 o más familias de antirretrovirales incluidos en el programa de acceso expandido de maraviroc en Europa fue del 32% según el ensayo de Trofile®. En la misma población se observó una sobreestimación de la cantidad de pacientes infectados con variantes X4-trópicas al utilizar las herramientas WebPSSM_{X4/R5-8} (hasta el 48%) y WebPSSM_{SI/NSI-6,4} (hasta el 47%). Estos resultados fueron similares en la población de pacientes procedentes del ensayo ALLEGRO, con prevalencia de virus X4-trópicos del 25% de acuerdo con Trofile®, del 46% según WebPSSM_{X4/R5-8} y del 44% según WebPSSM_{SI/NSI-6,4} (**figura 13**).



AEM: Acceso expandido de maraviroc en Europa.

Figura 13. Prevalencia de virus X4-trópicos en las poblaciones de estudio según Trofile®, WebPSSM_{X4/R5-8} y WebPSSM_{SI/NSI-6,4}.

Cabe destacar que la proporción de resultados no reportables según el ensayo de Trofile® alcanzó el 17,2% frente a los 7,5% de los métodos genotípicos en la población de estudio. De hecho, en el subgrupo de pacientes en los que Trofile® no proporcionó resultados reportables (n=44), WebPSSM_{X4/R5-8} clasificó el 48% de las muestras (n=21) como R5-trópicas.

4.4. Discusión

Las herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral representan una alternativa más sencilla, rápida y económica en comparación con el método fenotípico Trofile®. Sin embargo, la validez de dichas herramientas genotípicas ha sido

cuestionada debido a la limitada concordancia observada al compararse con métodos fenotípicos en muestras clínicas.

Los resultados del presente estudio analizando 202 pacientes del acceso expandido de maraviroc en Europa muestran que la sensibilidad de las herramientas genotípicas es por lo general baja, entre el 31% y el 76%, lo que coincide con lo observado en estudios previos ([Low et al., 2007](#); [Recordon-Pinson et al., 2008](#); [Obermeier et al., 2008](#); [Soulié et al., 2008](#)). Esta falta de sensibilidad se observó incluso utilizando una metodología que aumentaba la sensibilidad de todas las herramientas: clasificar una muestra como X4-trópica cuando alguna de sus permutaciones aminoacídicas (en muestras con mezclas nucleotídicas) era clasificada como tal. Con el fin de mejorar más dicha sensibilidad se establecieron nuevos valores de umbrales optimizados para la identificación de virus X4-trópicos para las herramientas WebPSSM_{X4/R5} (-8) y WebPSSM_{SI/NSI} (-6,4) mediante el análisis de curvas ROC. Estos nuevos valores aumentaron la sensibilidad hasta superar el 80% en la cohorte de diseño y el 90% en la cohorte de validación, manteniendo en todo caso una especificidad de alrededor del 70%. Más importante aún, el valor predictivo negativo de ambos algoritmos era del 97% en la cohorte de validación, lo que significa que el 97% de las muestras clínicas clasificadas como R5-trópicas por cualquiera de los 2 nuevos algoritmos eran también clasificadas como R5-trópicas por Trofile®. Así, si la utilización de maraviroc se realizara en base a estos resultados, solo un 3% de los pacientes que iniciasen maraviroc serían clasificados como portadores de virus X4-trópicos según el ensayo fenotípico Trofile®. Sin embargo, junto con este aumento del valor predictivo negativo, observamos que el valor predictivo positivo cae a un 49-51%. Esto significa que hasta la mitad de las

muestras clasificadas como X4-trópicas por los métodos genotípicos son R5-trópicas según Trofile®. De este modo, la mitad de los pacientes a los que no se administraría maraviroc según estas nuevas herramientas genotípicas, en realidad si se podrían beneficiar del antagonista de CCR5 según los resultados de Trofile®.

Es importante señalar que los resultados fenotípicos de tropismo viral utilizados en el presente estudio se realizaron utilizando la versión original del ensayo de Trofile®, capaz de detectar variantes virales minoritarias X4-trópicas cuando estas representan al menos un 5-10% de la población viral. Desde 2008 este ensayo ha sido reemplazado por la versión mejorada ESTA® (*Enhanced Sensitivity Trofile Assay*), capaz de detectar variantes minoritarias que representen al menos un 0,3% de la población viral. Por ello, es esperable que esta sobreestimación de virus X4-trópicos que se observa cuando se utilizan las nuevas herramientas genotípicas WebPSSM_{X4/R5-8} y WebPSSM_{SI/NSI-6,4} no sea tan acusada si los datos fueran re-evaluados utilizando como ensayo fenotípico ESTA®.

Además, hay que destacar la gran cantidad de resultados no reportables cuando se utiliza Trofile®, superiores al 15%, mientras que para los métodos genotípicos este valor está siempre por debajo del 7,5%. Teniendo en cuenta todos estos datos, si el uso terapéutico de maraviroc se determinara en base a resultados genotípicos la proporción de pacientes que se identificarían como “no candidatos” a la utilización del fármaco por una sobreestimación de virus X4-trópicos estaría parcialmente compensada por la de aquellos identificados como “candidatos” por tener un resultado de tropismo R5 por métodos genotípicos y no reportable por métodos

fenotípicos. Estos resultados plantean además la posibilidad de emplear las herramientas genotípicas para un filtrado selectivo de muestras, mediante el cual un resultado genotípico R5-trópico con las nuevas herramientas se tomaría como válido y definitivo, mientras que para un resultado X4-trópico se podría recomendar la realización adicional del ensayo de Trofile® en la misma muestra, especialmente en pacientes con limitadas opciones terapéuticas.

En resumen, los resultados de este trabajo apoyan la fiabilidad de las herramientas WebPSSM_{X4/R5-8} y WebPSSM_{SI/NSI-6,4} para guiar el uso terapéutico de antagonistas de CCR5 en la práctica clínica, permitiendo la determinación del tropismo viral de una forma más rápida y sencilla. Estos nuevos algoritmos se podrían llevar a cabo en cualquier laboratorio con tecnología para realizar estudios genotípicos, sin ningún requerimiento tecnológico adicional, y evitando las limitaciones logísticas y técnicas relacionadas con el ensayo de Trofile®.

Sin embargo, estas conclusiones están basadas en una comparación entre resultados genotípicos y fenotípicos de tropismo viral. El principal objetivo para la determinación del tropismo viral en pacientes VIH-1 es el de guiar el uso terapéutico con antagonistas de CCR5. Por eso, la validación de los métodos genotípicos para uso clínico requiere, más que demostrar una buena correlación con el ensayo de Trofile®, la demostración de su capacidad para identificar pacientes respondedores y no respondedores a un tratamiento con antagonistas de CCR5. Para ello son necesarios estudios que evalúen la respuesta virológica a antagonistas de CCR5 en base a una determinación genotípica basal del tropismo viral.

Los resultados obtenidos en este estudio han sido publicados en “*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*” en Marzo de 2009 (Anexo II).

Referencia: Eva Poveda, Eduardo Seclén, María del Mar González, Federico García, Natalia Chueca, Antonio Aguilera, Juan José Rodríguez, Juan González-Lahoz, Vicente Soriano. **Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;63(5):1006-1010.

ESTUDIO 3:

**Dinámica del tropismo viral en pacientes VIH+
bajo tratamiento antirretroviral efectivo:
implicaciones para la determinación del
tropismo viral en pacientes con viremia
indetectable**

5.1. Diseño y objetivo del estudio

El objetivo del presente estudio fue caracterizar la dinámica del tropismo viral en pacientes con infección por VIH-1 en tratamiento antirretroviral efectivo (ARN-VIH < 50 copias/mL). El interés de este estudio surge porque el antagonista de CCR5 maraviroc puede ser considerado una opción terapéutica en pacientes con viremia indetectable en los que se plantea un cambio de tratamiento por problemas de intolerancia/toxicidad, interacciones farmacológicas, o en estrategias de simplificación/intensificación. En un contexto de viremia indetectable, existen dos estrategias posibles para la determinación del tropismo: i) a partir de una muestra de plasma almacenada (-80°C) previa al inicio del tratamiento y por tanto con viremia detectable, o ii) a partir de una muestra de CMSP en el momento en el que se plantea el cambio a maraviroc cuando el paciente ya presenta viremia suprimida. Los resultados derivados de este trabajo permitirán caracterizar la dinámica del tropismo viral en un contexto de viremia indetectable, además de informar sobre si existen diferencias significativas entre el uso de plasma almacenado o CMSP reciente para la determinación del tropismo viral.

Para ello, se seleccionó un grupo de pacientes con infección por VIH-1 en tratamiento antirretroviral y con viremia suprimida durante al menos dos años. El tropismo viral se determinó a partir de muestras basales de plasma y CMSP (antes del inicio del tratamiento) y se comparó con aquellas realizadas a partir de CMSP recogidas después de dos años o más de tratamiento antirretroviral y con viremia suprimida (**Figura 14**).

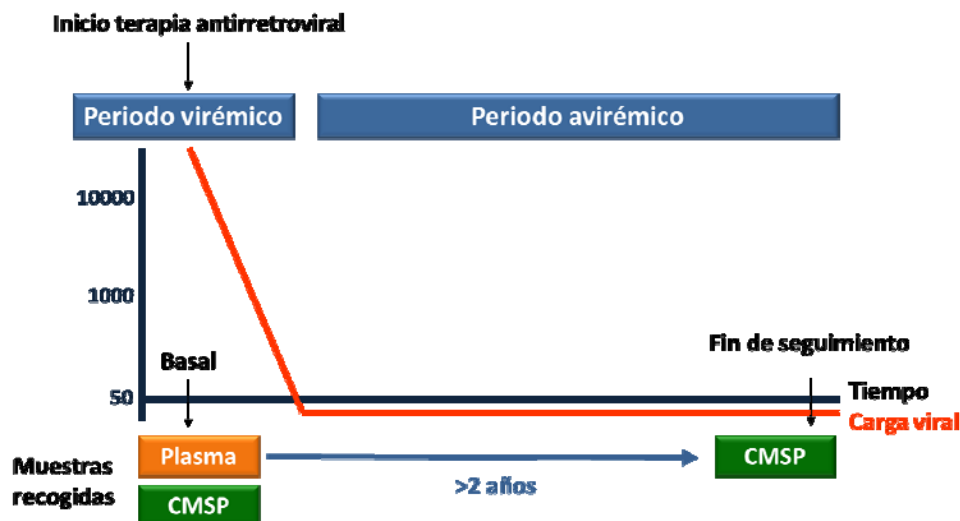


Figura 14. Diseño del estudio.

5.2. Pacientes y métodos

5.2.1. Población de estudio

Se identificaron de forma retrospectiva pacientes con infección por VIH-1 en seguimiento regular en el Hospital Carlos III de Madrid que hubieron iniciado terapia antirretroviral, alcanzando y manteniendo viremia indetectable durante un periodo mínimo de 2 años. Se recogió información demográfica de los pacientes analizados, del régimen antirretroviral que iniciaron y del subtipo genético del VIH-1.

De cada paciente se seleccionaron muestras de plasma y CMSP antes del inicio de la terapia antirretroviral y por tanto con viremia detectable. Además, se seleccionó una muestra de CMSP al final del seguimiento correspondiente al momento de viremia suprimida.

5.2.2. Determinación genotípica del tropismo viral

En todas las muestras seleccionadas se amplificó y secuenció la región V3 para determinar genotípicamente el tropismo viral, tal y como se ha explicado con anterioridad. La predicción del tropismo viral se llevó a cabo con geno2pheno_{FPR=10%} y WebPSSM_{X4/R5-8}, versión de WebPSSM optimizada para una detección más sensible de virus X4-trópicos. Las predicciones de tropismo viral desde plasma se realizaron a partir de la extracción de ARN viral, mientras que las de CMSP se hicieron a partir de la extracción de ADN proviral.

5.3. Resultados

5.3.1. Características basales de la población de estudio

Se incluyeron un total de 78 pacientes con infección por VIH-1 que cumplían los criterios del estudio. De ellos, había disponibles 76 muestras de plasma basales y 57 muestras de CMSP basales y 74 muestras de CMSP correspondientes al final del periodo de seguimiento.

Todos los pacientes analizados estaban infectados con subtipo B, según el análisis filogenético de las regiones *env* y *pol*. La mediana de carga viral en el momento basal fue de 4,2 [3,2-4,7] logs copias ARN-VIH/mL. Entre las muestras de plasma basales, el 18% (14/76) de ellas tenían una carga viral entre 51 y 1000 copias ARN-VIH/mL, con una mediana de carga viral en este subgrupo de muestras de 2,6 [2,1-2,7] logs copias ARN-VIH/mL. La mediana del recuento de células T CD4+ basales fue de 341 [217-478]

células/mm³, mientras que la mediana del nadir de células T CD4+ fue de 247 [105-321] células/mm³. La mediana de tiempo de seguimiento fue de 3,5 [2,3-4,4] años, con un rango de 2,1 a 6,5 años.

5.3.2. Determinación genotípica del tropismo viral

Se obtuvieron resultados de tropismo viral en el 81% (167/207) de las muestras analizadas (Números de acceso de Genbank: GU265384-GU265550). La tasa de amplificación fue ligeramente superior entre las muestras basales con viremia detectable, tanto en plasma (64/76; 84%) como en CMSP (47/57; 83%) en comparación con las muestras de CMSP recogidas al final del seguimiento en un contexto de viremia indetectable (56/74; 76%). La tasa de amplificación fue menor en las muestras de plasma con menos de 1000 copias ARN-VIH/mL en comparación con las que presentaban niveles más altos, sin que existiesen diferencias significativas (79% vs. 86%, $p>0,1$). Cabe destacar que la mediana de tiempo de almacenamiento hasta su utilización fue de 6,1 [5,2-7,6] años en las muestras basales, mientras que para las muestras correspondientes al final del seguimiento fue de 2,6 [1,7-3,8] años, lo que podría explicar esta menor tasa de amplificación por un posible deterioro del material genético.

La proporción de virus X4-trópicos según WebPSSM_{X4/R5-8} fue del 33% para las muestras de plasma basales, 34% para las muestras basales de CMSP y 34% para las muestras de CMSP recogidas al final del seguimiento (**tabla 9**). Dado que los resultados

con $\text{geno2pheno}_{\text{FPR}=10\%}$ fueron similares a los de $\text{WebPSSM}_{\text{X4/R5-8}}$, solo se consideraron los últimos para los posteriores análisis.

Tipo de muestra	Prevalencia de virus X4-trópicos (n; %)
Plasma basales (n=64)	21 (32,8%)
CMSP basales (n=47)	47 (34,0%)
CMSP del final de seguimiento (n=56)	19 (33,9%)

Tabla 9. Prevalencia de virus X4-trópicos en los diferentes grupos de muestras según $\text{WebPSSM}_{\text{X4/R5-8}}$.

5.3.3. Concordancia entre los resultados de tropismo viral obtenidos a partir de muestras basales de plasma y CMSP

La correlación entre los resultados de tropismo de muestras virémicas de plasma y CMSP se evaluó en un total de 55 pacientes de los que se disponía de muestras pareadas. De ellas, se obtuvieron datos genotípicos en el 82% (45/55) de las muestras de plasma y en el 84% (46/55) de las muestras de CMSP basales lo que resultó en un total de 38 pacientes de los que se disponía de dato de tropismo para ambas muestras. La carga viral basal de este grupo de 38 pacientes fue de 4,16 [3,12-4,45] logs copias ARN-VIH/mL, con una mediana de células T CD4+ basales de 299 [156-416] cel/mm³ y un nadir de 250 [75-285] cel/mm³.

La mayoría de los pacientes (31/38; 82%) presentaron un tropismo concordante R5-trópico (21/31; 68%) o X4-trópico (10/31; 32%). En los 7 pacientes en los que se observaron diferencias en el tropismo viral basal (18%), 4 tenían un tropismo X4-

trópico en plasma y R5-trópico en CMSP, mientras que 3 tenían un tropismo R5-trópico en plasma y X4-trópico en CMSP, diferencias que no fueron significativas (**figura 15**).

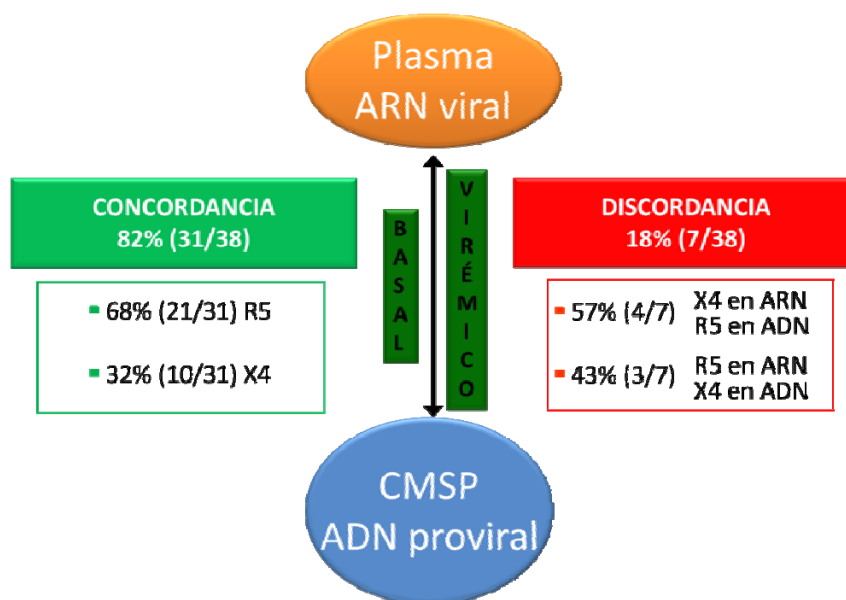


Figura 15. Correlación del tropismo viral basal en muestras de plasma y CMSP.

La discordancia entre los resultados del tropismo viral no pudo ser atribuida a diferencias en los niveles de viremia basal, recuento de células T CD4+ basales o al nadir de células T CD4+, tal y como se muestra en la **tabla 10**.

	Pacientes con tropismo concordante (n=31)	Pacientes con tropismo discordante (n=7)	p
Carga viral basal (log copias VIH-ARN/mL)	4,16 [3,06-4,53]	4,16 [3,14-4,42]	0,912
Células T CD4+ basales (células/mm ³)	284 [141-408]	400 [242-528]	0,263
Nadir CD4+ (células/mm ³)	252 [66-283]	247 [128-294]	0,907

Tabla 10. Asociación entre variables virales y del huésped con la discordancia en la determinación del tropismo viral entre muestras de plasma y CMSP.

5.3.4. Concordancia entre los resultados de tropismo viral obtenidos a partir de muestras de plasma basales y CMSP al final del seguimiento

Se identificaron un total de 72 pacientes con muestras disponibles (plasma basal y CMSP después de al menos dos años con viremia suprimida) para la realización de este análisis. Se obtuvieron resultados en el 83,3% (60/72) de las muestras de plasma basales y en el 76,4% (55/72) de muestras de CMSP recogidas al final del seguimiento. El análisis final se pudo realizar en 46 pacientes para los que se obtuvo un resultado de tropismo viral en ambas muestras. En este grupo de 46 pacientes, la carga viral basal fue de 4,33 [3,72-4,78] logs copias VIH-ARN/mL, el recuento de células T CD4+ basales de 367 [219-464] cel/mm³, el nadir de 252 [114-324] cel/mm³, y el tiempo de exposición a tratamiento antirretroviral de 3,75 [2,29-4,60] años.

En el momento basal, el 65% (30/46) de los pacientes presentaban un tropismo R5. Después de al menos dos años de tratamiento con viremia suprimida, el 80% de los pacientes mantuvieron el mismo tropismo viral, R5-trópico (54%) o X4-trópico (26%).

De los 9 pacientes que experimentaron un cambio de tropismo, éste ocurrió de R5 a X4 y viceversa, sin observarse diferencias significativas en la proporción de pacientes que cambiaron en una u otra dirección, tal y como se muestra en la **figura 16**.

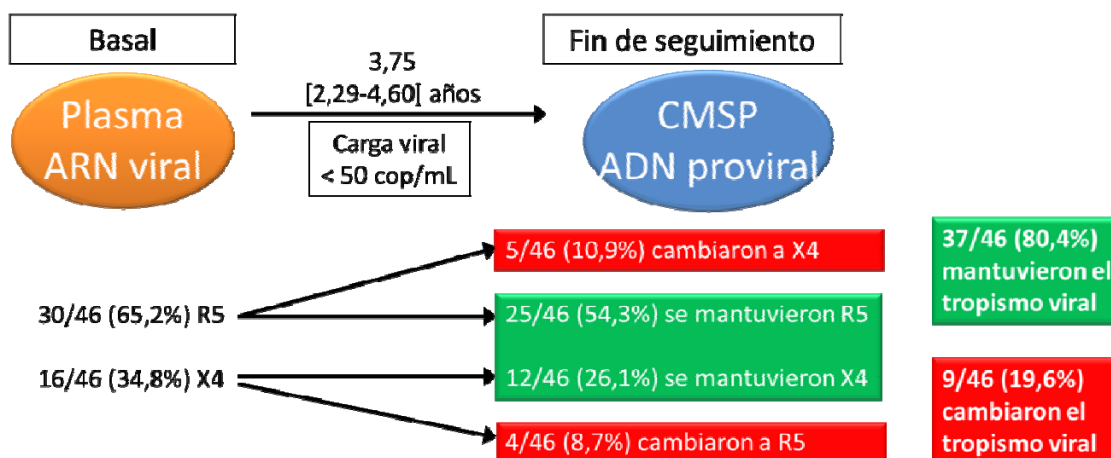


Figura 16. Dinámica del tropismo viral en la población de estudio después de al menos 2 años con viremia suprimida (plasma basal vs. CMSP final)

Los cambios de tropismo viral no se relacionaron con niveles más altos de viremia basal, menores recuentos de células T CD4+ en el momento basal, menor nadir de células T CD4+, ganancia de células T CD4+ durante el periodo de estudio, tiempo de exposición a terapia antirretroviral, o tipo de antirretroviral utilizado; tal y como se muestra en la **tabla 11**.

	Mantienen tropismo viral (n=37)	Cambio en tropismo viral (n=9)	p
Carga viral (log copias VIH-ARN/mL)	4,29 [3,68-4,75]	4,25 [3,38-4,66]	0,414
CD4+ (células/mm ³)	322 [182-414]	415 [282-517]	0,760
Nadir CD4+ (células/mm ³)	252 [97-340]	247 [134-290]	0,856
Ganancia de células CD4+ (células/mm ³)	184 [60-346]	107 [11-336]	0,651
Tiempo bajo terapia antirretroviral (años)	3,22 [2,07-4,09]	4,00 [2,16-4,48]	0,668
Régimen ARV			
Basado en NNRTI (%)	93,8	6,3	0,238
Basado en IP (%)	72,7	27,3	

Tabla 11. Factores virales y del huésped potencialmente relacionados con el cambio de tropismo viral (plasma basal vs. CMSP final) en pacientes VIH+ con viremia suprimida.

5.3.5. Concordancia entre los resultados de tropismo viral obtenidos en muestras de CMSP basales y del final del seguimiento

Se identificaron un total de 53 pacientes con muestras disponibles (CMSP basales y al final del seguimiento) para la realización de este análisis. Se obtuvieron resultados en el 81,1% (43/53) de las muestras de CMSP basales y en el 79,2% (42/53) de las muestras de CMSP al final del seguimiento. El análisis final se realizó en 33 pacientes de los que se obtuvo un resultado de tropismo en ambas muestras. Este grupo de pacientes tenía una carga viral basal de 4,16 [3,46-4,47] log copias VIH-ARN/mL, un recuento de células T CD4+ de 341 [156-460] cel/mm³, un nadir de 244 [91-280] cel/mm³ y un tiempo de exposición a terapia antirretroviral de 3,48 [2,32-4,61] años.

De los 33 pacientes con resultados de tropismo pareados, un 61% de las muestras basales fueron R5-trópicas. El 88% de los pacientes mantuvieron su tropismo basal R5-trópico o X4-trópico, a pesar de haber transcurrido más de 3 años con tratamiento antirretroviral virológicamente efectivo (**figura 17**). De los 4 pacientes que cambiaron su tropismo durante el periodo de seguimiento, 2 lo hicieron de R5 a X4 y 2 de X4 a R5, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

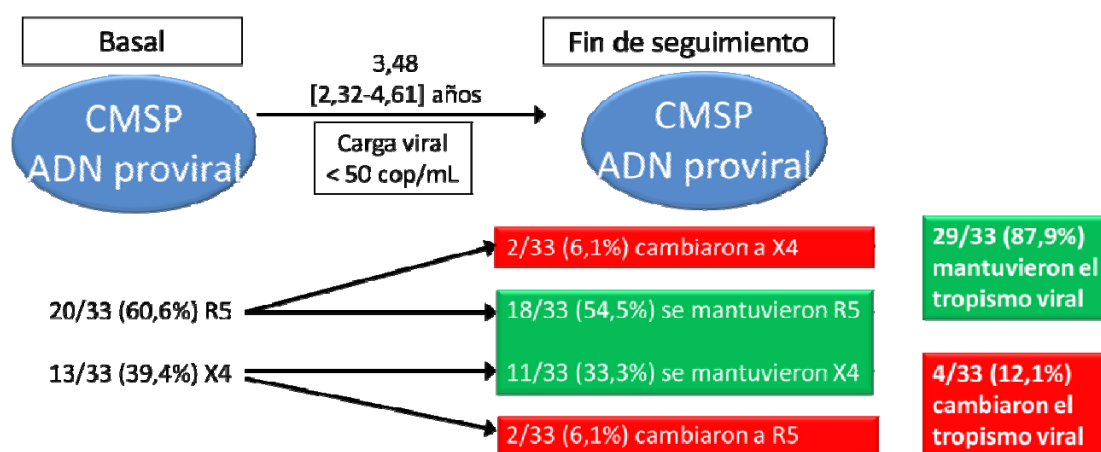


Figura 17. Dinámica del tropismo viral en la población de estudio después de al menos 2 años con viremia suprimida (CMSP basal vs. CMSP final).

En este caso, los cambios de tropismo viral observados tampoco se relacionaron con diferencias en los niveles de viremia basal, recuento de células T CD4+ basales, nadir de células T CD4+, la ganancia de células T CD4+ durante el periodo de seguimiento, tiempo de exposición a terapia antirretroviral, o tipo de antirretroviral utilizado; tal y como se muestra en la **tabla 12**.

	Mantienen tropismo viral (n=29)	Cambio en tropismo viral (n=4)	p
Carga viral basal (log copias VIH-ARN/mL)	4,07 [3,15-4,43]	4,33 [4,29-4,33]	0,628
CD4+ basales (células/mm ³)	324 [229-460]	132 [72-132]	0,270
Nadir CD4+ (células/mm ³)	244 [113-285]	142 [24-272]	0,361
Ganancia de células CD4+ (células/mm ³)	136 [35-379]	344 [120-344]	0,440
Tiempo bajo terapia antirretroviral (años)	3,37 [2,31-4,50]	2,07 [2,00-2,07]	0,544
Régimen ARV			
Basado en NNRTI (%)	100	0	0,238
Basado en IP (%)	81,3	18,8	

Tabla 12. Factores virales y del huésped potencialmente relacionados con el cambio de tropismo viral (CMSP basal vs. CMSP final) en pacientes VIH+ con viremia suprimida.

5.4. Discusión

En septiembre de 2007 la EMA aprobó el antagonista de CCR5 maraviroc para el rescate de pacientes pretratados en fracaso virológico y con resistencias a otras familias de antirretrovirales. Desde entonces, el ensayo fenotípico Trofile® ha sido considerado el ensayo de referencia para la determinación del tropismo viral. Sin embargo, este ensayo excluye a pacientes que presenten una carga viral menor a 1000 copias ARN-VIH/mL. En los últimos dos años, debido a las características clínicas de maraviroc, existe un interés creciente en considerar este antagonista de CCR5 en otros contextos clínicos además del rescate virológico (como los de simplificación o intensificación). Esta situación ha suscitado el interés hacia la evaluación de nuevas metodologías para la determinación del tropismo viral en pacientes con viremia

suprimida. En este contexto, existen dos estrategias posibles para la determinación del tropismo: i) a partir de una muestra de plasma almacenada (-80°C) previa al inicio del tratamiento y por tanto con viremia detectable, o ii) a partir de una muestra de CMSP en el momento en el que se plantea el cambio a maraviroc cuando el paciente ya presenta viremia suprimida.

En este estudio la interpretación del tropismo viral a partir de la región V3 se ha realizado utilizando los algoritmos de interpretación geno2pheno_{FPR=10%} y WebPSSM_{X4/R5-8}. En el contexto de muestras de plasma con viremia detectable, la concordancia entre la determinación del tropismo entre muestras de plasmas y CMSP virémicas almacenadas fue del 82%. En general, los cambios de tropismo observados durante un tratamiento antirretroviral efectivo fueron poco frecuentes, especialmente cuando estos se evaluaron entre CMSP basales y CMSP del final del seguimiento (12%). Los resultados obtenidos fueron similares, independientemente del algoritmo genotípico de interpretación utilizado.

La frecuencia de cambios de tropismo observada en estudios anteriores en pacientes con fracaso virológico en tratamiento antirretroviral seguidos durante una media de 1,7 a 5 años oscila entre un 13,2% a un 28,6%. (Briz et al., 2008; Lehmann et al., 2006). En general, en pacientes en tratamiento antirretroviral con viremia indetectable los cambios de tropismo observados a partir de ADN proviral son menos frecuentes. Sin embargo, existen diferencias entre las frecuencias de cambio descritas entre los diferentes estudios que podrían deberse a la heterogeneidad de las poblaciones de estudio así como a las diferentes herramientas utilizadas para determinar el tropismo.

En este sentido, hay estudios que han observado una frecuencia de cambio de tropismo viral de alrededor del 1% tras un año de seguimiento (Soulié et al., 2007), mientras que otros encuentran tasas de cambio de tropismo de hasta el 37,5% tras 5 años de seguimiento (Delobel et al., 2005).

Teniendo en cuenta que la determinación del tropismo viral está orientada a guiar el uso terapéutico del antagonista de CCR5 maraviroc, los cambios de tropismo que afectaría de forma negativa a la utilización del fármaco sería aquellos que ocurriesen de tropismo R5 a X4. Estos cambios representan el 11% en nuestra población de estudio cuando los resultados de tropismo se realizan en muestras basales de plasma y CMSP correspondientes al final del seguimiento, mientras que se reducen al 6% cuando la determinación del tropismo se realiza en CMSP basales y al final del seguimiento.

Aunque estudios anteriores han asociado los cambios de tropismo viral con un menor recuento basal de células T CD4+ o nadir, (Briz et al., 2008), esta asociación no se ha observado en este estudio. Un dato a tener en cuenta que podría explicar esta falta de asociación es el hecho de que los pacientes incluidos en este estudio en general presentan una buena situación inmunológica, tanto previa (nadir) como a lo largo del seguimiento. Sin embargo, serían necesarios más estudios para conocer finalmente el posible impacto del recuento de CD4+ en los cambios de tropismo.

La correlación entre muestras virémicas basales entre plasma y CMSP es muy alta (82%). Aunque los cambios de tropismo viral observados entre muestras basales y finales son relativamente escasos (hasta un 12%), estos cambios ocurren en ambas

direcciones (desde R5 a X4 y viceversa). Algunos estudios han observado un incremento en la detección de variantes X4-trópicas en CMSP comparado con la determinación a partir de plasma (Verhofstede et al., 2009), que en nuestro estudio no hemos observado. Este hecho podría explicarse porque el algoritmo de interpretación utilizado en este estudio WebPSSM_{X4/R5-8}, está diseñado específicamente para aumentar la sensibilidad para detectar variantes X4-trópicas, de manera que una posible mayor detección de variantes X4 a partir de CMSP podría no observarse.

En todo caso, se han de señalar las principales limitaciones del presente estudio, que incluye en primer lugar el limitado número de pacientes analizados. El éxito de amplificación obtenido en este estudio de la región V3 fue del 80%. Aunque existen determinadas características del estudio que pueden explicar este nivel de éxito de amplificación menor comparado con estudios anteriores, se deben de estudiar la introducción de mejoras con el fin de asegurar la eficacia de la técnica para su implementación en la práctica clínica. En segundo lugar, el seguimiento del estudio es diferente para cada uno de los pacientes, aunque todos ellos han superado los 2 años bajo terapia antirretroviral con viremia indetectable. Un análisis del cambio de tropismo evaluado en función del tiempo de exposición al tratamiento sería más adecuado para conocer de forma más detallada la tasa de cambio de tropismo. Por último, sería de gran interés la evaluación de la respuesta a maraviroc en función de las distintas predicciones de tropismo para responder definitivamente sobre cuál es la estrategia óptima para la determinación del tropismo viral en estas situaciones. En este sentido, pequeñas cohortes europeas han observado tasas de respuesta

viroológicas al antagonista de CCR5 superiores al 85% en pacientes con viremia indetectable en los que la determinación del tropismo viral se ha basado tanto en muestras de CMSP con viremia indetectable como en muestras de plasma con viremia detectable recogidas antes del inicio del tratamiento antirretroviral (Obermeier et al., 2010; Sierra et al., 2010). En cualquier caso, sería conveniente disponer de estudios que analicen un mayor número de pacientes y confirmen la fiabilidad de la determinación del tropismo viral en un contexto de viremia indetectable.

En resumen, en aquellos pacientes con viremia indetectable en los que maraviroc pueda ser considerado una opción terapéutica en estrategias de simplificación o intensificación los datos de este estudio sugieren que el tropismo viral puede ser determinado con una fiabilidad similar en muestras virémicas de plasma almacenadas o bien en muestras de CMSP correspondientes al periodo de viremia indetectable, siempre que la viremia se haya mantenido suprimida.

Los resultados obtenidos en este estudio han sido publicados en *“Journal of Antimicrobial Chemotherapy”* en Abril de 2010 (Anexo II).

Referencia: Eduardo Seclén, María del Mar González, Carmen de Mendoza, Vicente Soriano, Eva Poveda. **Dynamics of HIV tropism under suppressive antiretroviral therapy: implications for tropism testing in subjects with undetectable viraemia.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010 65(7):1493-1496.

ESTUDIO 4:

Validación de herramientas genotípicas para la determinación del tropismo del VIH-1 en la práctica clínica

6.1. Diseño y objetivo del estudio

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de las herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral en la identificación de pacientes respondedores y no respondedores al antagonista de CCR5 maraviroc en la práctica clínica.

Para ello, se seleccionaron de forma retrospectiva pacientes VIH-1 con tropismo R5-trópico determinado genotípicamente en los que en base a este resultado se inició una terapia con maraviroc. Se consideraron como objetivos primarios la respuesta virológica e inmunológica al tratamiento antirretroviral, así como la aparición de efectos adversos o toxicidades.

6.2. Pacientes y métodos

6.2.1. Población de estudio

Durante el periodo comprendido entre enero de 2009 y junio de 2011 se identificaron de forma retrospectiva pacientes con infección por VIH-1 con tropismo R5-trópico determinado genotípicamente en los que en base a este resultado se inició una terapia con maraviroc. Los pacientes fueron seleccionados de varios centros sanitarios españoles, incluyendo el Hospital Carlos III de Madrid, el Hospital de La Princesa de Madrid, el Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares y el Complejo Hospitalario de Toledo. Todos los pacientes seleccionados habían estado previamente expuestos a tratamiento antirretroviral, tal y como se especifica en las recomendaciones de la EMA para el uso terapéutico de maraviroc.

Se registraron datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio como sexo y edad, así como otros datos de interés como grupo de riesgo, tiempo de infección, carga viral basal, nivel de células T CD4+ basales y terapia antirretroviral concomitante. También se registró el número de fármacos activos registrado en el último informe de resistencias genotípicas

disponible interpretado según la Guía de resistencias a los antirretrovirales del 2011 publicada por la Red Española de Investigación en SIDA (RIS) (Anta et al., 2011).

Para los análisis de respuesta virológica e inmunológica los pacientes se clasificaron en función de la viremia plasmática en el momento inmediatamente anterior al inicio de maraviroc: detectable o indetectable (<50 copias ARN-VIH/mL). El inicio de maraviroc en pacientes con viremia indetectable se realizó en base a dos objetivos terapéuticos: i) aumentar el recuento de células T CD4+ en pacientes con una situación inmunológica comprometida, o ii) mejorar el perfil de toxicidad y/o tolerabilidad al tratamiento antirretroviral que estaban recibiendo. Teniendo en cuenta la diferencia en el recuento de CD4 en el momento de inicio de maraviroc en este grupo de pacientes, la respuesta inmunológica para estos subgrupos de pacientes se evaluó por separado.

6.2.2. Determinación genotípica del tropismo viral

La determinación del tropismo viral se realizó utilizando los métodos genotípicos WebPSSM_{X4/R5-8}, WebPSSM_{SI/NSI-6,4} y geno2pheno_{FPR=10%}, dando como resultado final la predicción consenso entre las tres herramientas. Las matrices de WebPSSM empleadas están optimizadas para una detección más sensible de variantes X4-trópicas del VIH-1 (Poveda et al., 2009). La utilización de las mismas puede producir una sobreestimación de virus X4-trópicos aunque minimiza el riesgo de seleccionar pacientes con un tropismo X4. El algoritmo de interpretación geno2pheno_{FPR=10%} es actualmente la herramienta genotípica recomendada por las guías españolas y europeas para la determinación del tropismo viral, en base a resultados recientemente publicados (Poveda et al., 2010; Vandekerckhove et al., 2011).

En pacientes con una carga viral basal por encima de las 500 copias ARN-VIH/mL la determinación del tropismo viral se realizó a partir de muestras de plasma (ARN viral). En

pacientes con viremia basal por debajo de las 500 copias ARN-VIH/mL o indetectable (<50 copias ARN-VIH/mL), la determinación del tropismo viral se realizó indistintamente en muestras de CMSP recogidas en el momento de considerar la terapia con maraviroc (ADN proviral), o bien en muestras de plasma correspondientes al último momento en el que el paciente presentó la viremia detectable alta (ARN viral).

6.3. Resultados

6.3.1. Características basales de la población de estudio

Se seleccionaron un total de 62 pacientes infectados por VIH-1 con tropismo R5-trópico que habían iniciado maraviroc en el periodo de reclutamiento.

La mayoría de los pacientes incluidos en el estudio eran hombres (82,3%; 51/62), con una mediana de edad de 46 [44-50] años. El 29,0% (18/62) de los pacientes habían sido usuarios de drogas por vía parenteral, mientras que el 56,5% (35/62) eran hombres que mantenían relaciones sexuales con otros hombres. El 4,8% (3/62) de ellos presentaban coinfección por VHB y el 27,4% (17/62) por VHC. La mayoría de los pacientes (95,2%; 59/62) estaban infectados por subtipo B, a excepción de 3 pacientes infectados por los subtipos CRF02_AG, CRF12_BF y G/B. La mayoría de los pacientes presentaban una infección de larga evolución, con una mediana de 17 [14-22] años desde su diagnóstico.

Treinta y tres pacientes (53,2%) iniciaron maraviroc con viremia basal detectable, con una mediana de carga viral de 2,63 [2,30-3,71] logs copias ARN-VIH/mL y una mediana de CD4+ de 305 [135-497] cel/mm³ (**tabla 13**). La terapia concomitante a maraviroc incluía fármacos de reciente aprobación de gran potencia antiviral como darunavir, raltegravir o etravirina en un 84,8% (28/33) de los casos. En concreto, el 39,4% (13/33) incluía darunavir, el 48,5% (16/33)

raltegravir y el 24,2% (8/33) etravirina. La mayoría de pacientes incluidos en este grupo (69,7%; 23/33) contaba en su régimen antirretroviral con 2 o más fármacos activos (excluyendo maraviroc), según la última actualización de la guía de interpretación de resistencias a los antirretrovirales de la RIS (2011).

Los 29 pacientes restantes presentaban viremia basal indetectable. La mediana de CD4+ en este grupo de pacientes fue de 289 [157-607] cel/mm³. La terapia concomitante a maraviroc incluía darunavir, raltegravir o etravirina en un 55,2% (16/29) de los casos. En concreto, el 27,6% (8/29) incluía darunavir, el 41,4% (12/29) raltegravir y el 6,9% (2/29) etravirina. La mayoría de pacientes pertenecientes a este grupo (79,3%; 23/29) incluía en su régimen antirretroviral 2 o más fármacos activos, excluyendo maraviroc. La información sobre resistencia genotípica a antirretrovirales se obtuvo de la muestra correspondiente al último momento en el que el paciente disponía de una carga viral detectable.

	Total	Viremia basal detectable	Viremia basal indetectable
Nro. de pacientes	62	33	29
Carga viral (logs copias ARN-VIH/mL)	1,93 [1,70-2,84]	2,63 [2,30-3,71]	1,7 [1,7-1,7]
Células T CD4+ (cel/mm ³)	298 [150-538]	305 [135-497]	289 [157-607]
DRV/r concomitante (n; %)	21; 33,9%	13; 39,4%	8; 27,6%
RAL concomitante (n; %)	28; 45,2%	16; 48,5%	12; 41,4%
ETR concomitante (n; %)	10; 16,1%	8; 24,2%	2; 6,9%
DRV/r, RAL o ETR concomitante (n; %)	44; 71,0%	28; 84,8%	16; 55,2%
2 o más fármacos activos excluyendo MVC (n; %)	46; 74,2%	23; 69,7%	23; 79,3%

Tabla 13. Características basales de la población de estudio.

6.3.2. Pacientes que inician maraviroc con viremia basal detectable

De los 33 pacientes que iniciaron maraviroc con carga viral detectable (>50 copias ARN-VIH/mL), se disponía de seguimiento clínico de todos los pacientes a mes 6, del 93,9% (31/33) a mes 12 y del 54,5% (18/33) a mes 24. En este grupo de pacientes solo se registró un caso de pérdida de seguimiento en el mes 9. Se consideró pérdida de seguimiento de un paciente cuando había transcurrido más de un año desde la última visita del paciente al centro.

6.3.2.1. Respuesta virológica

La respuesta virológica se definió como la proporción de pacientes que continuaban en tratamiento con maraviroc y tenían viremia indetectable 50 copias ARN-VIH/mL en el momento del análisis o un *blip* virológico confirmado. Este criterio excluía todos aquellos abandonos no relacionados con la eficacia virológica del régimen, los cuales se detallan más adelante. Sin embargo, los fracasos virológicos producidos por falta de eficacia antirretroviral se consideraban en el momento en el que se producían, así como en los análisis posteriores de respuesta virológica. Se consideraron *blips* virológicos aquellas determinaciones de carga viral detectables con cargas virales indetectables en el momento inmediatamente anterior y posterior a esta determinación.

La respuesta virológica en el grupo de pacientes que iniciaba maraviroc con viremia detectable fue del 84,4% (25/32) a mes 6, del 92,0% (23/25) a mes 12 y del 83,3% (10/12) a mes 24 (**figura 18**). Cuando la respuesta virológica se definió como alcanzar una viremia menor a 200 copias ARN-VIH/mL los valores fueron del 93,8% (30/32) a mes 6, del 96,0% (24/25) a mes 12 y del 83,3% (10/12) a mes 24.

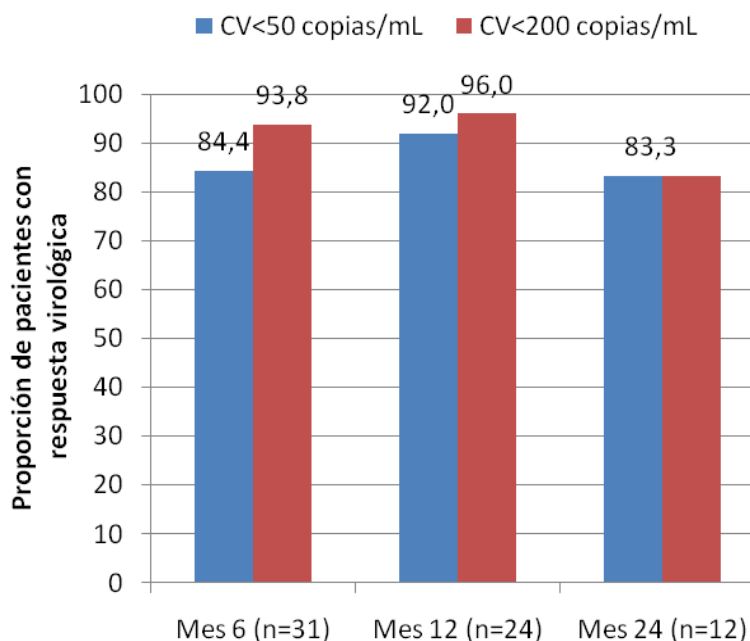


Figura 18. Respuesta virológica en pacientes que iniciaron maraviroc con viremia detectable.

6.3.2.2. Respuesta inmunológica

En el análisis de respuesta inmunológica se incluyeron todos aquellos pacientes de los que se disponía de información en el mes correspondiente y que continuaban recibiendo maraviroc. El nivel basal de células T CD4+ en este grupo de pacientes fue de 305 [135-497] cel/mm³ y aumentó significativamente hasta las 428 [266-705] cel/mm³ a mes 6 (Test de Wilcoxon; $p < 0,001$). Este incremento también fue significativo a mes 12, momento en el que se registró un nivel de células T CD4+ de 502 [312-727] cel/mm³ ($p < 0,001$). Sin embargo, a mes 24, aunque se observó un elevado nivel de células T CD4+ (498 [269-726] cel/mm³), este no fue significativamente superior con respecto al basal, probablemente por el menor número de pacientes con seguimiento a mes 24 (**figura 19**). La mediana del incremento de células T CD4+ a mes 6 fue de 69 [20-149] cel/mm³ a mes 6, de 114 [37-223] cel/mm³ a mes 12 y de 43 [-61-268] cel/mm³ a mes 24.

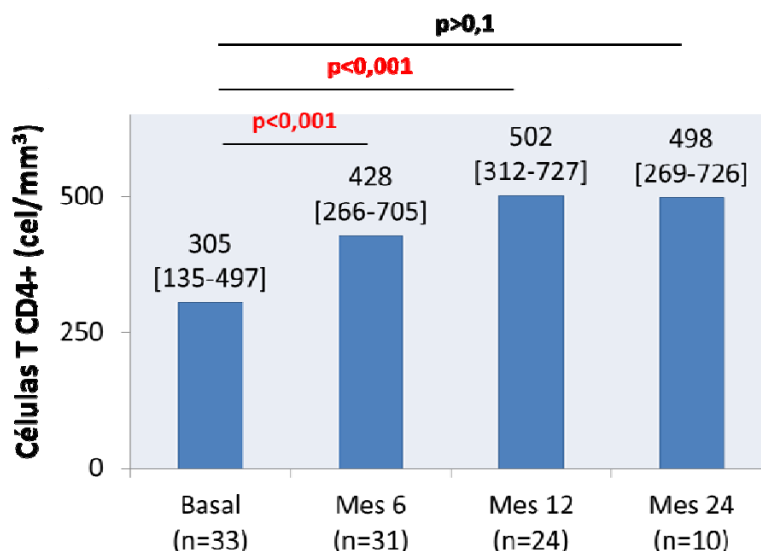


Figura 19. Respuesta inmunológica en pacientes que iniciaron maraviroc con viremia detectable.

6.3.2.3. Fracasos virológicos y abandonos

Se registraron un total de 5 abandonos de la medicación no relacionados con eficacia virológica y 2 fracasos virológicos.

Entre los abandonos no relacionados con eficacia virológica del régimen antirretroviral figuraron: i) dos casos de intolerancia digestiva al régimen antirretroviral que no remitieron tras 5 y 6 meses de terapia, ii) dos casos por decisión personal de los pacientes a mes 6 y 13 y i) un caso de retirada de maraviroc por no observarse un incremento significativo de las células T CD4+ tras 8 meses de terapia (que era el objetivo principal de la estrategia terapéutica).

El primer fracaso virológico se produjo en un paciente en el que se sustituyó etravirina por maraviroc, manteniendo darunavir potenciado con ritonavir y raltegravir como terapia concomitante tras 2 cargas virales detectables confirmadas. En ese momento no se dispuso de un informe de resistencias genotípicas a antirretrovirales debido a que no se consiguió amplificar el gen *pol*, posiblemente por la baja carga viral de la muestra basal (114 copias ARN-

VIH/mL). Dicho paciente no llegó a alcanzar viremia indetectable durante la terapia con maraviroc, aunque se mantuvo con viremias bajas (por debajo de las 200 copias). Tras 9 meses desde el inicio de maraviroc, se registró un repunte de la carga viral de 146.000 copias ARN-VIH/mL. En este momento el tropismo viral continuó siendo R5-trópico y no se observaron mutaciones de resistencia ni a raltegravir ni a darunavir, lo que podría indicar una falta de adherencia al régimen antirretroviral.

El segundo fracaso virológico se produjo en un paciente en el que sustituyó enfuvirtida por maraviroc manteniendo el resto de componentes del régimen compuesto por tenofovir, lamivudina, zidovudina, etravirina y darunavir potenciado con ritonavir. En este momento no se dispuso de informe de resistencias por no conseguir amplificar el gen *pol*, de nuevo posiblemente por la baja carga viral de la muestra basal (272 copias ARN-VIH/mL). En este caso, se alcanzó viremia indetectable tras 6 meses de terapia, aunque las determinaciones posteriores de carga viral fueron detectables, con 101 copias ARN-VIH/mL a mes 12, 1.120 copias ARN-VIH/mL a mes 17 y 41.600 copias ARN-VIH/mL a mes 21, momento en el que se produjo el cambio de maraviroc por un régimen optimizado según el informe de resistencias. En este caso, el virus cambió su tropismo a X4-trópico, era resistente a zidovudina, tenofovir y etravirina, aunque se mantuvo sensible a lamivudina y darunavir.

6.3.3. Pacientes que inician maraviroc con viremia basal indetectable

De los 29 pacientes que iniciaron maraviroc con carga viral indetectable (<50 copias ARN-VIH/mL), se disponía de seguimiento de todos los pacientes a mes 6, del 87,7% (26/29) a mes 12 y del 75,9% (22/29) a mes 24. En este grupo de pacientes se registraron 4 pérdidas de seguimiento tras 7, 10, 13 y 15 meses de terapia con maraviroc, respectivamente.

6.3.3.1. Respuesta virológica

La respuesta virológica, definida como la proporción de pacientes que mantenían viremia indetectable (<50 copias ARN-VIH/mL) o tenían *blip* virológicos confirmados, fue del 89,3% a mes 6, del 95,5% a mes 12 y del 91,7% a mes 24 (**figura 20**). Cuando la indetectabilidad se definió como menor de 200 copias ARN-VIH/mL, los valores fueron idénticos.

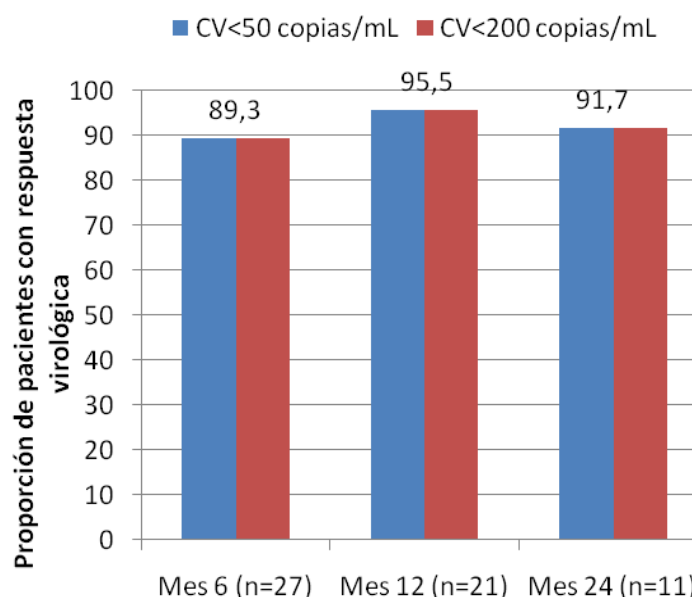


Figura 20. Respuesta virológica en pacientes que iniciaron maraviroc con viremia indetectable

6.3.3.2. Respuesta inmunológica

Se establecieron 2 grupos de pacientes para el análisis: i) pacientes en los que se inició maraviroc con objetivo de aumentar el recuento de células T CD4+; y ii) pacientes en los que el cambio de terapia que incluía maraviroc se debía a problemas de toxicidad y/o intolerancia u otro motivo asociado al régimen anterior.

Entre los 15 pacientes que iniciaron maraviroc para incrementar su recuento de células CD4+ la cifra basal fue de 162 [108-235] cel/mm³. En este grupo de pacientes se produjo un

incremento significativo del nivel de células T CD4+ a mes 6, alcanzando las 204 [132-272] cel/mm³ (p=0,011). No se observaron diferencias significativas en el nivel de células T CD4+ ni a mes 12 (139 [128-197] cel/mm³; p>0,1) ni a mes 24 (176 [149-220] cel/mm³; p>0,1) respecto al nivel basal (**figura 21**). La mediana del incremento de células T CD4+ en este grupo de pacientes fue de 30 [7-85] cel/mm³ a mes 6, 25 [11-50] cel/mm³ a mes 12 y de 25 [-29-46] cel/mm³ a mes 12.

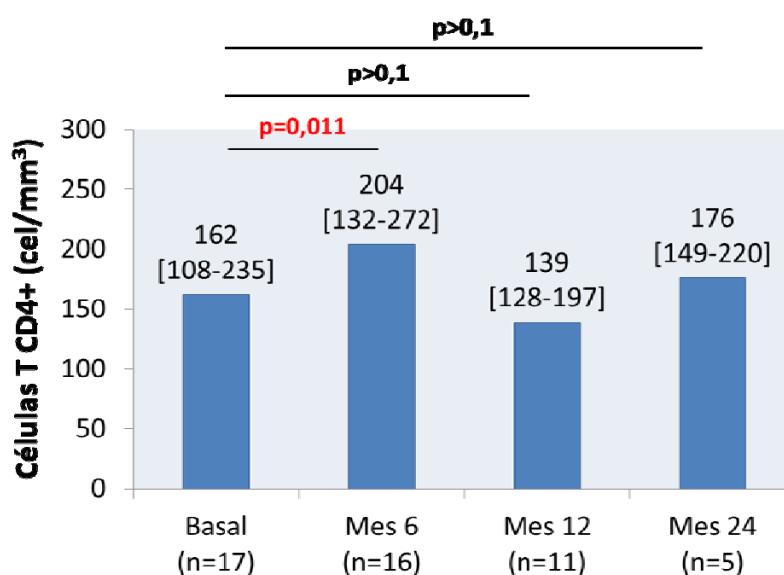


Figura 21. Respuesta inmunológica en pacientes que iniciaron maraviroc con viremia indetectable y el objetivo de incrementar su recuento de células T CD4+.

El nivel basal de células T CD4+ en el grupo de los 14 pacientes que iniciaron maraviroc por toxicidad y/o intolerancia al tratamiento antirretroviral fue de 607 [468-711] cel/mm³. No se observaron diferencias significativas en los niveles de CD4+ tras 6 meses de terapia con maraviroc (569 [437-656] cel/mm³; p>0,1), 12 meses (672 [482-799] cel/mm³; p>0,1) o 24 meses (648 [631-725] cel/mm³; p>0,1) (**figura 22**). La mediana del incremento de células T CD4+ en este grupo de pacientes fue de -18 [-97-57] cel/mm³ a mes 6, 37 [-39-178] cel/mm³ a mes 12 y de 84 [-76-195] cel/mm³ a mes 12.

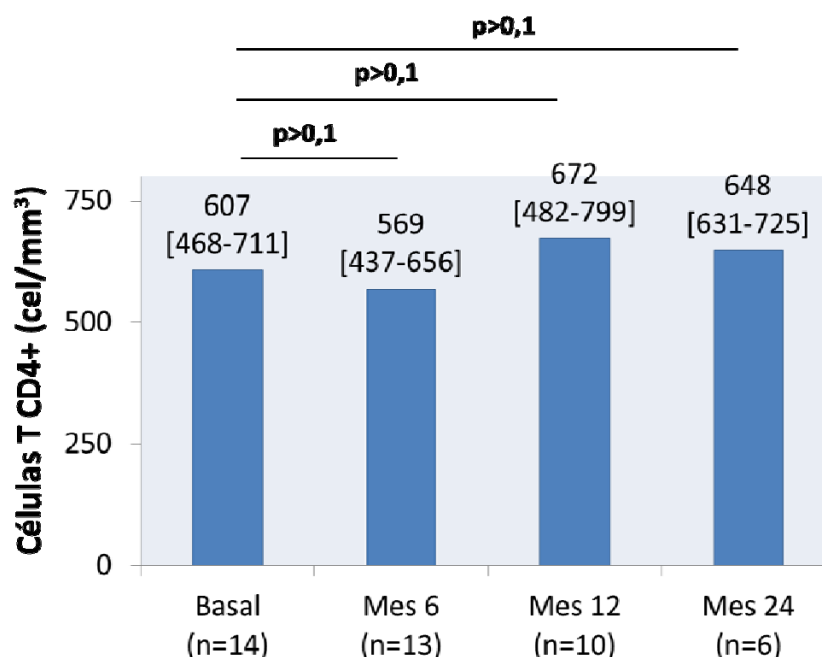


Figura 22. Respuesta inmunológica en pacientes que iniciaron maraviroc con viremia indetectable por problemas de toxicidad y/o intolerancia.

6.3.3.3. Fracasos virológicos y abandonos

Se registraron un total de 6 abandonos de la medicación no relacionados con eficacia virológica y 1 fracaso virológico.

Entre los abandonos no relacionados con eficacia virológica del régimen antirretroviral figuraron: i) dos casos de retirada de al no observarse un aumento significativo de células T CD4+ tras 13 meses de terapia en ambos casos (Δ CD4: 1 y -4 cel/mm³), ii) un caso de abandono de medicación por decisión personal del paciente tras 10 meses de terapia (Δ CD4: 131 cel/mm³), iii) un caso de intolerancia digestiva a maraviroc que no remitió tras 7 meses de terapia (Δ CD4: 78 cel/mm³), iv) un caso por efecto secundario de terapia concomitante (aumento de transaminasas por atazanavir) tras 13 meses de terapia (Δ CD4: 32 cel/mm³) y v) un caso por aumento de viremia de VIH-2 tras 17 meses de terapia, manteniendo la viremia VIH-1 indetectable en un paciente con coinfección por VIH-1 y VIH-2 (Δ CD4: 18 cel/mm³).

El único fracaso virológico registrado se produjo en un paciente que sustituyó darunavir/r por maraviroc debido a un aumento de las transaminasas asociado al inhibidor de la proteasa, manteniendo tenofovir y emtricitabina coformulado como terapia concomitante. En la siguiente visita de seguimiento del paciente, que ocurrió tras un mes desde el inicio del nuevo régimen, se observó que la carga viral había aumentado desde niveles indetectables hasta 191 copias ARN-VIH/mL, por lo que se decidió volver al régimen antirretroviral anterior. En este momento se procedió a amplificar V3 y el gen *pol* para la determinación del tropismo viral y la caracterización de resistencias a análogos de nucleós(t)ido, respectivamente, obteniendo una amplificación negativa en ambos casos. Según un informe de resistencias genotípicas realizado 2 años antes del inicio de la terapia con maraviroc, el paciente presentaba resistencias históricas a emtricitabina, de manera que este fracaso temprano podría explicarse por una biterapia encubierta.

6.6.4. Caracterización de la región V3 en el fracaso

En ninguno de los 3 fracasos registrados se observaron en el momento basal los polimorfismos 4L, 11R y 19S dentro de la región V3, cuya presencia se había asociado con una mayor probabilidad de fracaso virológico en los ensayos clínicos MOTIVATE y MERIT (Lewis et al., 2010). En los 2 pacientes en el que se pudo analizar la región V3 en el fracaso, uno de ellos mantuvo el tropismo R5-trópico y el otro cambió a X4 trópico. En el paciente que mantuvo el tropismo R5-trópico se registraron los cambios G5N, R10R/K, S11S/G, V12I, H13T/S, L14I, S18K/R, T22A, Q25D, I26I/V y Q32K, que no coincidieron con los cambios observados previamente en los fracasos virológicos registrados en los ensayos MOTIVATE y MERIT (Lewis et al., 2010). En el paciente cuyo tropismo viral cambió a X4-trópico se seleccionaron los cambios S11S/R, I12I/V, I14S, G15R, P16T, G17R, A19A/V, D25D/H y Q32Q/R. Es importante

destacar entre estos cambios la selección de aminoácidos de carga positiva en ambas posiciones 11 y 25, así como la pérdida del dominio GPG de las posiciones 15 a 17, ambos fenómenos asociados con un tropismo X4-trópico.

6.4. Discusión

La aprobación del antagonista de CCR5 maraviroc para el tratamiento de la infección por VIH-1 ha fomentado la determinación del tropismo viral en la práctica clínica. La complejidad de los ensayos fenotípicos impulsaron el desarrollo de ensayos genotípicos que, basados en el análisis de la región V3 de la envuelta, permiten predecir el tropismo viral de una manera más rápida y sencilla. Estudios iniciales mostraron que, aunque la especificidad de dichos ensayos genotípicos era elevada, la sensibilidad para la detección de virus X4-trópicos era baja tomando como referencia datos fenotípicos ([Low et al., 2007](#); [Raymond et al., 2008](#)). Otros estudios más recientes mostraron mejores valores de sensibilidad, manteniendo elevados valores de especificidad ([Poveda et al., 2009](#); [Seclén et al., 2010](#)). Sin embargo, los datos más relevantes sobre la elevada fiabilidad de las herramientas genotípicas derivaron de análisis retrospectivos de los ensayos clínicos de maraviroc en pacientes pretratados (MOTIVATE 1&2 y A4001029), que demostraron que dichas herramientas, independientemente de presentar menor sensibilidad para la detección de virus X4-trópicos, ofrecían la misma eficacia que el ensayo original de Trofile® para identificar pacientes respondedores a la terapia con maraviroc ([McGovern et al., 2010a](#)). Esta efectividad se extendió a pacientes naïve en el reanálisis retrospectivo del ensayo MERIT ([McGovern et al., 2010b](#)), igualando en este caso los resultados del ensayo fenotípico ESTA® con una mayor sensibilidad para detectar variantes X4-trópicas.

Los datos principales de respuesta virológica a maraviroc derivan de los citados ensayos clínicos MOTIVATE y MERIT. En el ensayo MOTIVATE (Gulick et al., 2008), en el que pacientes pretratados recibieron maraviroc además de un régimen antirretroviral optimizado, los porcentajes de respuesta virológica fueron del 43% al 46% a semana 48. En los pacientes naïve reclutados para el ensayo MERIT (Cooper et al., 2010), que recibieron maraviroc junto con 2 análogos de nucleósido, el porcentaje de respuesta virológica a semana 48 fue del 65%.

Fuera de los ensayos de validación y registro de maraviroc, los estudios publicados sobre respuesta clínica a maraviroc basados en resultados fenotípicos de tropismo son escasos. En algunos de ellos se ha realizado adicionalmente un análisis retrospectivo utilizando diferentes herramientas genotípicas.

En una cohorte francesa de 112 pacientes que iniciaron maraviroc en régimen de rescate en base a resultados de Trofile® (Recordon-Pinson et al., 2010) la respuesta virológica fue del 85% (94/111) a mes 1, del 84% (88/105) a mes 3 y del 68% (67/98) a mes 6. El tropismo viral basal se determinó retrospectivamente utilizando hasta 13 herramientas genotípicas incluyendo geno2pheno_{FPR=10%} y WebPSSM_{X4/R5}. Del 2% al 21% de los pacientes que habían sido clasificados como R5-trópicos por Trofile®, tenían virus X4-trópicos según las herramientas genotípicas. La respuesta virológica fue menor en los pacientes infectados con virus X4-trópicos según la versión clínica de geno2pheno_{FPR=10%} en los meses 1, 3 y 6. En el análisis multivariante que incluía la carga viral basal, el número de fármacos activos y el tropismo del VIH-1 según varias herramientas, el único factor significativo predictor de respuesta virológica a mes 1 y 3 fue el tropismo viral determinado por geno2pheno_{FPR=10%}.

La cohorte de Berlín está formada por un grupo de 160 pacientes cuyos criterios de inclusión fueron: i) haber iniciado maraviroc y ii) tener una determinación de tropismo viral basal, ya fuese fenotípica o genotípica. La determinación del tropismo en pacientes que iniciaban una

terapia de rescate con maraviroc en condiciones de viremia detectable se llevó a cabo utilizando el ensayo fenotípico de Trofile® y, en muchos casos, se repitió utilizando procedimientos genotípicos. En concreto, la herramienta genotípica que se empleó fue geno2pheno_{CORECEPTOR} siguiendo las recomendaciones alemanas de interpretación del tropismo viral que establecen que valores de FPR por encima del 20% sean considerados como R5, por debajo del 12,5% sean considerados como X4, y para valores intermedios se tenga en cuenta las opciones terapéuticas del paciente antes de prescribir maraviroc ([Walter et al., 2009](#)).

Los resultados de respuesta virológica a semana 96 en la cohorte de Berlín se han presentado recientemente ([Obermeier et al., 2012](#)). Entre los 106 pacientes que iniciaron maraviroc como estrategia de rescate terapéutico, la respuesta virológica fue del 58% a semana 24, del 54% a semana 48 y del 51% a semana 96.

Los resultados de respuesta virológica del presente estudio en una cohorte de 33 pacientes que iniciaron maraviroc como terapia de rescate en base a una predicción genotípica del tropismo viral, la respuesta virológica a mes 6 (semana 24), 12 (semana 48) y 24 (semana 96) superó el 83%. Los resultados obtenidos en nuestro estudio, junto con los reportados previamente, avalan la fiabilidad de las herramientas genotípicas para la determinación del tropismo viral para guiar el uso terapéutico de maraviroc en estrategias de rescate virológico.

Las características de maraviroc en cuanto a su perfil de seguridad y metabolismo lipídico lo convierten en un candidato ideal a considerar en cambios de tratamiento que, pese a ser virológicamente efectivos, presentan problemas por aparición de toxicidades u otros efectos secundarios. Los datos de respuesta clínica a maraviroc en este contexto son muy escasos. Uno de los principales problemas a resolver es el de establecer una metodología óptima para la determinación del tropismo viral en estos pacientes con viremia indetectable. En este sentido, varios trabajos, incluido uno de los que integran la presente tesis, han demostrado que existe

una buena concordancia entre las determinaciones de tropismo viral realizadas en muestras de plasma y CMSP (Seclén et al. 2010; Obermeier et al., 2011; De Luca et al., 2012). Otros trabajos demuestran que existe escasa evolución del tropismo viral cuando el paciente está recibiendo un tratamiento antirretroviral efectivo y presenta viremia indetectable, incluso después de 4 años de terapia (Seclén et al., 2010; Chueca et al., 2012; De Luca et al., 2012). Según estos datos, en un contexto de viremia indetectable la determinación del tropismo viral se debería de realizar preferentemente a partir de ADN proviral en muestras de CMSP correspondientes al período de tratamiento con viremia indetectable o, alternativamente, a partir de muestras de plasma almacenadas antes del inicio de la terapia con viremia detectable. Con esta estrategia, se están desarrollando actualmente varios ensayos clínicos para validar prospectivamente las herramientas genotípicas basadas en CMSP como guía para el uso terapéutico de antagonistas de CCR5 en un contexto de viremia indetectable. Este es el caso del ensayo clínico multicéntrico PROTEST (*Genotypic Tropism Testing In Proviral Dna To Guide CCR5 Antagonist Treatment In Subjects With Undetectable HIV-1 Viremia*”), actualmente en fase de reclutamiento en 27 centros hospitalarios españoles.

En la citada cohorte de Berlín, un grupo de 54 pacientes inició maraviroc en un contexto de viremia indetectable en base a una determinación genotípica del tropismo viral basal según geno2pheno. En este grupo de pacientes un 87% mantuvieron la viremia indetectable a semana 24, un 81% a semana 48 y un 71% a semana 96.

En el presente estudio, del 89% al 96% de los pacientes que iniciaban maraviroc con viremia indetectable la mantuvieron suprimida. Estos valores son superiores a los obtenidos en la cohorte alemana de pacientes y de nuevo confirman la fiabilidad de las herramientas genotípicas de determinación del tropismo viral también en el contexto de viremia indetectable.

De los 62 pacientes que iniciaron maraviroc en base a la determinación genotípica del tropismo, se identificaron un total de 3 fracasos: un caso por falta de actividad de los fármacos acompañantes a maraviroc (biterapia encubierta), otro por falta de adherencia al tratamiento y el último por la selección de variantes X4-trópicas. Así pues, los fracasos virológicos registrados no se pueden atribuir a errores en la interpretación genotípica del tropismo basal.

En cuanto a beneficio inmunológico, los ensayos clínicos MOTIVATE y MERIT demostraron mayores incrementos en el recuento de células CD4+ en las ramas que incluían maraviroc con respecto a las comparadoras, lo que sugiere que los antagonistas de CCR5 podrían tener un impacto especialmente positivo en la recuperación de células T CD4+, más allá de su actividad antiviral. Sin embargo, los resultados de 2 grandes meta-análisis que comparaban regímenes que incluían antagonistas de CCR5 (maraviroc o vicriviroc) con otros que no lo incluían han mostrado resultados controvertidos, que confirman ([Wilkin et al., 2010a](#)) o descartan ([Pichenot et al., 2008](#)) una mejor respuesta inmunológica de los antagonistas de CCR5 respecto a otras familias de antirretrovirales.

El uso de maraviroc en pacientes inmunosuprimidos ha dado lugar a resultados también controvertidos en cohortes más pequeñas de pacientes. En el estudio MARIMUNO, una cohorte francesa de 60 pacientes inmunosuprimidos infectados con virus X4-trópicos y R5-trópicos en los que se añadió maraviroc a la terapia antirretroviral, se observó un incremento significativo de CD4+ a semana 48, que fue independiente del tropismo viral, del nadir de células T CD4+ y del tipo de tratamiento antirretroviral ([Cuzin et al., 2011](#)). En otra cohorte italiana de 96 pacientes inmunosuprimidos que se estratificaron a añadir maraviroc a su terapia antirretroviral o continuar con su régimen antirretroviral sin modificar, se observó que los pacientes que recibían maraviroc tenían una mayor probabilidad de superar el umbral de las 200 cel/mm³ que los que no lo recibían tras 48 semanas de terapia (62,2% vs 35,6%; $p = 0,01$). Sin embargo este efecto se perdía al ajustar por CD4+ basales ([Rusconi et al., 2011](#)). En

otros dos pequeños estudios, que evaluaban 6 y 9 pacientes respectivamente, no se encontró beneficio inmunológico al añadir maraviroc a un régimen antiretroviral virológicamente efectivo tras 24 semanas de terapia (Stepanyuk et al., 2009; Evering et al., 2010). Estos resultados negativos estuvieron en concordancia con los análisis del ensayo ACTG 5256, que analizaba también el impacto inmunológico de la terapia con maraviroc en un grupo de 34 pacientes inmunosuprimidos (Wilkin et al., 2010b).

En el presente estudio, los pacientes que iniciaron maraviroc siguiendo una estrategia de rescate virológico experimentaron un incremento significativo del recuento de células T CD4+ a meses 6 y 12. En aquellos pacientes con viremia indetectable basal en los que maraviroc se inició como estrategia para incrementar el recuento de células T CD4+, los resultados muestran una recuperación inmunológica significativa a mes 6, pero no a mes 12 ó 24. Estos datos, en conjunto con algunos anteriores, avalan el efecto inmunológicamente beneficioso de la terapia con maraviroc a corto plazo. Además, confirman que las herramientas genotípicas de determinación tropismo viral son adecuadas para guiar la prescripción del fármaco como estrategia para incrementar el recuento de células CD4+, ya sea a partir de muestras de plasma previamente almacenadas o a partir de CMSP.

En resumen, los resultados del presente estudio sobre respuesta a maraviroc en base a una determinación genotípica del tropismo viral basal avalan la utilidad de las herramientas genotípicas como guía para el uso terapéutico de maraviroc, ya sea en un contexto de viremia detectable o indetectable.

Los resultados parciales de este estudio fueron presentados oralmente en el “9th European Workshop on HIV & Hepatitis-Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance”, que tuvo lugar en Paphos, Chipre en Marzo de 2011 (Anexo II).

Referencia: Eduardo Seclén, Vicente Soriano, María del Mar González, Cristina Sarriá, Laura Prósper, María José Sepúlveda, José Sanz, José Arranz, Eva Poveda. “**Clinical validation of a genotypic HIV tropism assay to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists**” Reviews in Antiviral Therapy & Infectious Diseases. Vol. 2; 2011. Abstract O-23. p: 26-27.

CONCLUSIONES

1. La concordancia para la determinación del tropismo del VIH-1 entre diferentes herramientas genotípicas y la prueba fenotípica Phenoscript® se situó entre un 63% y un 85% en función del método genotípico empleado. Los predictores WebPSSM_{X4/R5}, Geno2pheno_{FPR=5%} y un algoritmo combinado de la regla 11/25 y de la carga neta mostraron los mejores valores de concordancia, sensibilidad y especificidad para la detección de variantes X4-trópicas, alcanzando valores superiores al 80%.
2. La sensibilidad de los métodos genotípicos para la detección de variantes X4-trópicas fue superior en pacientes infectados con subtipo B respecto a los infectados con subtipos no-B (75% vs. 44%, respectivamente).
3. La concordancia para la determinación genotípica del tropismo viral fue mayor a partir del ADN proviral obtenido desde CMSP que en ARN obtenido desde plasma cuando se compararon con la prueba fenotípica Phenoscript (80% vs. 68%).
4. La sensibilidad de diferentes herramientas genotípicas en comparación con la prueba fenotípica Trofile® para la detección de variantes X4-trópicas fue del 64% al 76% en una cohorte de pacientes VIH+ pretratados que participaron en el programa de acceso expandido de maraviroc.
5. La frecuencia de cambios de tropismo viral observada en pacientes VIH+ en tratamiento antirretroviral con viremia suprimida por un período superior a dos años fue baja, del 12-19%. Por tanto, en un contexto de viremia indetectable, la determinación del tropismo viral se debería realizar preferentemente a partir de ADN proviral y, alternativamente, podría realizarse en muestras de plasma almacenadas antes del inicio de la terapia y, por tanto, con viremia detectable.
6. En pacientes VIH+ que iniciaron una terapia de rescate con maraviroc atendiendo a la determinación genotípica del tropismo viral la tasa de respuesta virológica a los 24 meses fue del 83%, lo que se acompañó de un incremento significativo en el recuento de CD4+ a los 6 y 12 meses. Cuando maraviroc se inició con viremia indetectable (cambio por toxicidad o por limitada respuesta inmunológica) el 92% de los pacientes persistieron con viremia suprimida a los 24 meses. Sin embargo el recuento de linfocitos T CD4+ apenas se modificó.

7. Las herramientas genotípicas WebPSSM_{XR-8}, WebPSSM_{SN-6,4} y geno2pheno_{FPR=10%}, utilizadas para la determinación del tropismo viral antes de iniciar una terapia con maraviroc identifican de forma aceptable pacientes respondedores a los antagonistas de CCR5, tanto en pacientes con viremia detectable como en pacientes con viremia indetectable bajo tratamiento antirretroviral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alkhatib, G., et al., *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1*. Science, 1996. **272**(5270): p. 1955-8.
2. Anta, L., C. De Mendoza, and V. Soriano, *Guía de resistencias a los antirretrovirales 2011*. 2011: Permanyer.
3. Asjo, B., et al., *Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection*. Lancet, 1986. **2**(8508): p. 660-2.
4. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
5. Berger, E.A., *HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection*. AIDS, 1997. **11 Suppl A**: p. S3-16.
6. Berger, E.A., et al., *A new classification for HIV-1*. Nature, 1998. **391**(6664): p. 240.
7. Brenchley, J.M., et al., *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 749-59.
8. Briggs, D.R., et al., *Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (coreceptor usage and tropism for macrophages)*. AIDS, 2000. **14**(18): p. 2937-9.
9. Briz, V., et al., *Impact of antiretroviral therapy on viral tropism in HIV-infected patients followed longitudinally for over 5 years*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(2): p. 405-10.
10. Brumme, Z.L., et al., *Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals*. J Infect Dis, 2005. **192**(3): p. 466-74.
11. Cardozo, T., et al., *Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007. **23**(3): p. 415-26.
12. Chabot, D.J., et al., *Mutagenesis of CXCR4 identifies important domains for human immunodeficiency virus type 1 X4 isolate envelope-mediated membrane fusion and virus entry and reveals cryptic coreceptor activity for R5 isolates*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6598-609.
13. Chan, D.C., et al., *Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein*. Cell, 1997. **89**(2): p. 263-73.
14. Chen, B., et al., *Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core*. Nature, 2005. **433**(7028): p. 834-41.
15. Chen, X., et al., *Structural improvement of unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2009. **65**(Pt 4): p. 339-47.

16. Cheng-Mayer, C., et al., *Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host*. Science, 1988. **240**(4848): p. 80-2.
17. Choe, H., et al., *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1135-48.
18. Chueca, N., et al., *Long term follow up of longitudinal plasma and proviral DNA coreceptor usage in HIV-1 patients under HAART*, in *Tenth European Meeting on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiretroviral Drug Resistance*. 2012: Barcelona, España.
19. Chueca, N., et al., *Improvement in the determination of HIV-1 tropism using the V3 gene sequence and a combination of bioinformatic tools*. J Med Virol, 2009. **81**(5): p. 763-7.
20. Clotet, B., et al., *Efficacy and safety of darunavir-ritonavir at week 48 in treatment-experienced patients with HIV-1 infection in POWER 1 and 2: a pooled subgroup analysis of data from two randomised trials*. Lancet, 2007. **369**(9568): p. 1169-78.
21. Collman, R., et al., *Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types*. J Exp Med, 1989. **170**(4): p. 1149-63.
22. Connor, R.I., et al., *Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals*. J Exp Med, 1997. **185**(4): p. 621-8.
23. Cooper, D.A., et al., *Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naive subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2010. **201**(6): p. 803-13.
24. Cormier, E.G. and T. Dragic, *The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8953-7.
25. Cormier, E.G., et al., *Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complexes*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5541-9.
26. Cuzin, L., S. Trabelsi, and G. Mouillot, *ANRS 145 Marimuno Study: a Multi-centre Prospective Pilot Study Evaluating Intensification of Stable Antiviral Therapy with Maraviroc in HIV-1-infected Patients with Insufficient Immune Restoration Despite Persistently Controlled Viral Replication*, in *Thirteenth European AIDS Conference*. 2011: Belgrado, Serbia.

27. Daar, E.S., et al., *Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(5): p. 643-9.
28. De Jong, J.J., et al., *Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution*. J Virol, 1992. **66**(11): p. 6777-80.
29. De Luca, A., et al., *HIV-1 co-receptor tropism evolution in naïve patients undergoing successful ART: concordance of DNA vs RNA and triplicate vs siglicate sequencing, in Tenth European Meeting on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiretroviral Drug Resistance*. 2012: Barcelona, España.
30. Delobel, P., et al., *Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(5): p. 1572-80.
31. Delobel, P., et al., *R5 to X4 switch of the predominant HIV-1 population in cellular reservoirs during effective highly active antiretroviral therapy*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **38**(4): p. 382-92.
32. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
33. Doms, R.W. and S.C. Peiper, *Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry*. Virology, 1997. **235**(2): p. 179-90.
34. Doranz, B.J., et al., *Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 2752-61.
35. Doranz, B.J., et al., *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1149-58.
36. Dorr, P., et al., *Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4721-32.
37. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 667-73.
38. Emerman, M. and M.H. Malim, *HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1880-4.
39. Evans, L.A., et al., *Differential ability of human immunodeficiency virus isolates to productively infect human cells*. J Immunol, 1987. **138**(10): p. 3415-8.

40. Evering, T., et al., *Antiviral and Immunological Effects of Intensification of Suppressive ART with Maraviroc, a CCR5 Antagonist*, in *Seventeenth Conference on Retroviruses on Opportunistic Infections*. 2010: San Francisco, CA, USA.
41. Fear, W.R., et al., *Differential tropism and chemokine receptor expression of human immunodeficiency virus type 1 in neonatal monocytes, monocyte-derived macrophages, and placental macrophages*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1334-44.
42. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
43. Fenyo, E.M., et al., *Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates*. J Virol, 1988. **62**(11): p. 4414-9.
44. Fouchier, R.A., et al., *Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 3183-7.
45. Gallo, R.C., A. Sliski, and F. Wong-Staal, *Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus*. Lancet, 1983. **2**(8356): p. 962-3.
46. Garrido, C., et al., *Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(3): p. 887-91.
47. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
48. Gulick, R.M., et al., *Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection*. N Engl J Med, 2008. **359**(14): p. 1429-41.
49. Hardy, W.D., et al., *Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment-experienced patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010. **55**(5): p. 558-64.
50. Harouse, J.M., et al., *Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs*. Science, 1999. **284**(5415): p. 816-9.
51. Hoffman, T.L. and R.W. Doms, *HIV-1 envelope determinants for cell tropism and chemokine receptor use*. Mol Membr Biol, 1999. **16**(1): p. 57-65.
52. Hoffman, T.L., et al., *Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6359-64.
53. Huang, C.C., et al., *Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4*. Science, 2007. **317**(5846): p. 1930-4.

54. Huang, C.C., et al., *Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core*. Science, 2005. **310**(5750): p. 1025-8.
55. Isaka, Y., et al., *Small amino acid changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determines the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5*. Virology, 1999. **264**(1): p. 237-43.
56. Jacobson, J.M., et al., *Phase 2a study of the CCR5 monoclonal antibody PRO 140 administered intravenously to HIV-infected adults*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(10): p. 4137-42.
57. Jacobson, J.M., et al., *Antiviral activity of single-dose PRO 140, a CCR5 monoclonal antibody, in HIV-infected adults*. J Infect Dis, 2008. **198**(9): p. 1345-52.
58. Jensen, M.A., et al., *A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 4698-704.
59. Jensen, M.A. and A.B. van 't Wout, *Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis*. AIDS Rev, 2003. **5**(2): p. 104-12.
60. Karpas, A., *Human retroviruses in leukaemia and AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2004. **79**(4): p. 911-33.
61. Koot, M., et al., *Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS*. Ann Intern Med, 1993. **118**(9): p. 681-8.
62. Kwong, P.D., et al., *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 648-59.
63. Lalezari, J., et al., *Safety, efficacy, and pharmacokinetics of TBR-652, a CCR5/CCR2 antagonist, in HIV-1-infected, treatment-experienced, CCR5 antagonist-naïve subjects*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2011. **57**(2): p. 118-25.
64. Lehmann, C., et al., *Stable coreceptor usage of HIV in patients with ongoing treatment failure on HAART*. J Clin Virol, 2006. **37**(4): p. 300-4.
65. Lewis, M., et al., *Genotypic Analysis of the HIV-1 gp120 V3 Loop for Treatment Experienced Patients Enrolled into the MOTIVATE Studies and Who Received Maraviroc + Optimised Background Therapy (OBT), in Seventeenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. 2010: San Francisco, CA, USA.
66. Li, Q., et al., *Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1148-52.
67. Lin, G., et al., *Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins*. J Virol, 2003. **77**(2): p. 931-42.

68. Low, A.J., et al., *Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates*. AIDS, 2007. **21**(14): p. F17-24.
69. Mattapallil, J.J., et al., *Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1093-7.
70. McGovern, R.A., et al., *Virologic Response to Maraviroc of Treatment-naïve Patients in the MERIT Trial*, in *Seventeenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. 2010: San Francisco, CA, USA.
71. McGovern, R.A., et al., *Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies*. AIDS, 2010. **24**(16): p. 2517-25.
72. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 761-70.
73. Miedema, F., M. Tersmette, and R.A. van Lier, *AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system*. Immunol Today, 1990. **11**(8): p. 293-7.
74. Milich, L., B. Margolin, and R. Swanstrom, *V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability*. J Virol, 1993. **67**(9): p. 5623-34.
75. Mondor, I., S. Ugolini, and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3623-34.
76. Moore, J.P., et al., *The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2004. **20**(1): p. 111-26.
77. Moore, J.P., A. Trkola, and T. Dragic, *Co-receptors for HIV-1 entry*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(4): p. 551-62.
78. Moulard, M., et al., *Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120*. J Virol, 2000. **74**(4): p. 1948-60.
79. Moyle, G.J., et al., *Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2005. **191**(6): p. 866-72.
80. Oberlin, E., et al., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 833-5.

81. Obermeier, M., et al., *Tropism testing from proviral DNA - analysis of a subgroup from the Berlin Maraviroc cohort*, in *Eighth European HIV Drug Resistance Workshop*. 2010.
82. Obermeier, M., et al., *Week 96 update on the Berlin maraviroc cohort*, in *Tenth European Meeting on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiretroviral Drug Resistance*. 2012: Barcelona, España.
83. Obermeier, M.J., et al., *Determination of HIV-1 coreceptor usage in German patients- comparison of genotypic methods with the Trofile phenotypic assays*, in *Ninth International Congress on Drug Therapy in HIV Infection*. 2008: Glasgow, UK.
84. Obermeier, M.J., et al. *High concordance in results of genotypic tropism testing from viral RNA and proviral DNA using geno2pheno[coreceptor] is not influenced by viral load - results of a multicentre comparison*. in *International Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies*. 2011. Los Cabos, México.
85. Pichenot, M., et al., *Efficacy of new antiretroviral drugs in treatment-experienced HIV-infected patients: a systematic review and meta-analysis of recent randomized controlled trials*. *HIV Med*, 2012. **13**(3): p. 148-55.
86. Pillai, S., et al., *A new perspective on V3 phenotype prediction*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2003. **19**(2): p. 145-9.
87. Pope, M. and A.T. Haase, *Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection*. *Nat Med*, 2003. **9**(7): p. 847-52.
88. Popovic, M., et al., *Isolation and transmission of human retrovirus (human t-cell leukemia virus)*. *Science*, 1983. **219**(4586): p. 856-9.
89. Poveda, E., et al., *Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists*. *AIDS Rev*, 2010. **12**(3): p. 135-48.
90. Poveda, E., et al., *Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatic tools for determining HIV co-receptor use*. *AIDS*, 2007. **21**(11): p. 1487-90.
91. Poveda, E., et al., *Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists*. *J Antimicrob Chemother*, 2009. **63**(5): p. 1006-10.
92. Raymond, S., et al., *Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism*. *AIDS*, 2008. **22**(14): p. F11-6.
93. Recordon-Pinson, P., et al., *Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor use versus a phenotypic assay and correlation with the virological response to*

- maraviroc: the ANRS GenoTropism study*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(8): p. 3335-40.
94. Resch, W., N. Hoffman, and R. Swanstrom, *Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks*. Virology, 2001. **288**(1): p. 51-62.
 95. Richman, D.D. and S.A. Bozzette, *The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression*. J Infect Dis, 1994. **169**(5): p. 968-74.
 96. Rusconi, S., E. Colella, and F. Adorni, *ANRS 145 Maraviroc (MVC) as Intensification Strategy in Immunological Non-responder HIV-infected Patients with Virologic Success on HAART*, in *Thirteenth European AIDS Conference*. 2011: Belgrado, Serbia.
 97. Schellekens, P.T., et al., *Low T-cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected men*. J Clin Immunol, 1990. **10**(2): p. 121-7.
 98. Schreiber, M., et al., *Loss of antibody reactivity directed against the V3 domain of certain human immunodeficiency virus type 1 variants during disease progression*. J Gen Virol, 1996. **77** (Pt 10): p. 2403-14.
 99. Schuitemaker, H., et al., *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1354-60.
 100. Schuitemaker, H., et al., *Monocyctotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture*. J Virol, 1991. **65**(1): p. 356-63.
 101. Seclen, E., et al., *Dynamics of HIV tropism under suppressive antiretroviral therapy: implications for tropism testing in subjects with undetectable viraemia*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(7): p. 1493-6.
 102. Seclen, E., et al., *High sensitivity of specific genotypic tools for detection of X4 variants in antiretroviral-experienced patients suitable to be treated with CCR5 antagonists*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(7): p. 1486-92.
 103. Seelamgari, A., et al., *Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 2388-413.
 104. Shaheen, F. and R.G. Collman, *Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors*. Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(1): p. 7-16.
 105. Sierra, S., et al., *Genotypic coreceptor analysis*. Eur J Med Res, 2007. **12**(9): p. 453-62.

106. Sierra, S., et al., *Tropism determination and clinical outcome of 61 patients under MVC treatment*, in *Eighth European HIV Drug Resistance Workshop*. 2010.
107. Sing, T., et al., *Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates*. *Antivir Ther*, 2007. **12**(7): p. 1097-106.
108. Skrabal, K., et al., *Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model*. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(2): p. 279-84.
109. Soulie, C., et al., *Comparison of two genotypic algorithms to determine HIV-1 tropism*. *HIV Med*, 2008. **9**(1): p. 1-5.
110. Soulie, C., et al., *HIV-1 X4/R5 co-receptor in viral reservoir during suppressive HAART*. *AIDS*, 2007. **21**(16): p. 2243-5.
111. Steigbigel, R.T., et al., *Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(4): p. 339-54.
112. Stepanyuk, O., et al., *Impact of adding maraviroc to antiretroviral regimens in patients with full viral suppression but impaired CD4 recovery*. *AIDS*, 2009. **23**(14): p. 1911-3.
113. Suleiman, J., et al., *Vicriviroc in combination therapy with an optimized regimen for treatment-experienced subjects: 48-week results of the VICTOR-E1 phase 2 trial*. *J Infect Dis*, 2010. **201**(4): p. 590-9.
114. Tersmette, M., et al., *Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex*. *J Virol*, 1988. **62**(6): p. 2026-32.
115. Tersmette, M. and F. Miedema, *Interactions between HIV and the host immune system in the pathogenesis of AIDS*. *AIDS*, 1990. **4 Suppl 1**: p. S57-66.
116. Tilton, J.C. and R.W. Doms, *Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection*. *Antiviral Res*, 2010. **85**(1): p. 91-100.
117. Trkola, A., et al., *CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5*. *Nature*, 1996. **384**(6605): p. 184-7.
118. Vandekerckhove, L.P., et al., *European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing*. *Lancet Infect Dis*, 2011. **11**(5): p. 394-407.
119. Varmus, H. and N. Nathanson, *Science and the control of AIDS*. *Science*, 1998. **280**(5371): p. 1815.
120. Veazey, R.S., et al., *Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection*. *Science*, 1998. **280**(5362): p. 427-31.

121. Verhofstede, C., et al., *CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009. **50**(2): p. 126-36.
122. Walter, H., et al., *Empfehlung zur Bestimmung des HIV-1-Korezeptor-Gebrauchs [Directrices Germano-austriacas para la determinación del tropismo viral]*. 2009: <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>.
123. Weissenhorn, W., et al., *Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 426-30.
124. Westby, M. and E. van der Ryst, *CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection*. Antivir Chem Chemother, 2005. **16**(6): p. 339-54.
125. Whitcomb, J.M., et al., *Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(2): p. 566-75.
126. Wilkin, T., et al., *Maraviroc Intensification for Suboptimal CD4+ Cell Response Despite Sustained Virologic Suppression: ACTG 5256*, in *Seventeenth Conference on Retroviruses on Opportunistic Infections*. 2010: San Francisco, CA, USA.
127. Wilkin, T.J., et al., *The relationship of CCR5 antagonists to CD4+ T-cell gain: a meta-regression of recent clinical trials in treatment-experienced HIV-infected patients*. HIV Clin Trials, 2010. **11**(6): p. 351-8.
128. Wood, A. and D. Armour, *The discovery of the CCR5 receptor antagonist, UK-427,857, a new agent for the treatment of HIV infection and AIDS*. Prog Med Chem, 2005. **43**: p. 239-71.
129. Wu, L., et al., *CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 179-83.
130. Xiao, L., et al., *CCR5 coreceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 isolates: delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage*. Virology, 1998. **240**(1): p. 83-92.
131. Zaitseva, M., et al., *Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection*. Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1369-75.
132. Zhang, L., et al., *In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 5035-45.

133. Zhu, P., et al., *Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**(26): p. 15812-7.
134. Zhu, P., et al., *Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 847-52.
135. Zhu, P., et al., *Cryoelectron tomography of HIV-1 envelope spikes: further evidence for tripod-like legs*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000203.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APOBEC3G: Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, enzima citidin-deaminasa

ARN: Ácido ribonucleico

CCR5: C-C chemokine receptor type 5

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica

CXCR4: CXC chemokine Receptor 4

FDA: Food and Drug Administration

IC50: Concentración de fármaco necesaria para inhibir la producción viral un 50%

IP: Inhibidores de la proteasa

ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido

ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido

Kb: Kilobases

LTR: Long Terminal Repeat, secuencias terminales largas repetidas

MVC: Maraviroc

NEF: *negative factor*, factor negativo, proteína accesoria del VIH

PB: Pares de bases nitrogenadas

PBS: *Phosphate Buffered Saline*, tampón fosfato salino

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

TARGA: Terapia Antirretroviral de Gran Actividad

VIF: *Viral infectivity factor*, Factor de infectividad viral, proteína accesoria del

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VPR: Viral protein R, Proteína viral R, proteína accesoria del VIH

VPU: Viral protein U, Proteína viral U, proteína accesoria del VIH

ANEXOS

ANEXO I. Publicaciones surgidas de esta tesis

1. Seclén E, Soriano V, González MM, Gómez S, Thielen A, Poveda E. *"High Concordance between PSSM and Geno2pheno Algorithms for Genotypic Interpretation of HIV-1 Tropism - V3 Length as the Major Cause of Disagreement"*. Journal of Clinical Microbiology. 2011; 49(9):3380-2.
2. Seclén E. *"Gene Therapy Towards HIV Cure"*. AIDS Research and Human Retroviruses. 2011. Vol. 13(2):130-131.
3. Seclén E, Soriano V, González MM, Martín-Carbonero L, Gellermann H, Cairns V, Distel M, Kadus W, Poveda E. *"Impact of Baseline HIV-1 tropism on Viral Response and CD4 Gains in HIV-infected Patients on First-line Antiretroviral Therapy"*. Journal of Infectious Diseases. 2011;204(1):139-44.
4. Seclén E, Soriano V, González MM, González-Lahoz J, Poveda E. *"Severe Immune Suppression in Patients Infected with R5-tropic HIV-1 Strains is Associated with Increased gp120 Net Charge at Variable Regions"*. AIDS Research and Human Retroviruses. 2011; 27(9):965-7.
5. Rodríguez JJ, Seclén E, Poveda E, Varela E, Regueiro B, Aguilera A. *"Variability in HIV viral tropism determination using different genotypic algorithms in patients infected with B versus non-B HIV-1 subtypes"*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011; 29(1):4-8.
6. Poveda E, Seclén E, Soriano V. *"Genotype Testing to Determine HIV Coreceptor Tropism"*. Journal of Viral Entry. 2010. Vol. 4(1):12-20.
7. Seclén E, González MM, Lapaz M, Rodríguez C, Del Romero J, Aguilera A, De Mendoza C, Soriano V, Poveda E. *"Primary Resistance to Maraviroc in a Large Set of R5-V3 Viral Sequences from HIV-1-Infected Patients"*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010. Vol. 65(12):2502-4.
8. Seclén E, González MM, De Mendoza C, Soriano V, Poveda E. *"Dynamics of HIV Tropism under Suppressive Antiretroviral Therapy: Implications for Tropism Testing in Subjects with Undetectable Viremia"*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010. vol. 65(7):1493-6.

9. Seclén E, Garrido C, González MM, González-Lahoz J, De Mendoza C, Soriano V, Poveda E. *"High Sensitivity of Specific Genotypic Tools for Detection of X4 Variants in Antiretroviral-experienced Patients Suitable to be Treated with CCR5 Antagonists"*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010 vol. 65(7):1486-92.
10. Labarga P, Medrano J, Seclén E, Poveda E, Rodríguez-Novoa S, Morello J, De Mendoza C, Vispo E, Soriano V. *"Safety and Efficacy of Tenofovir/Emtricitabine plus Nevirapine in HIV-infected Patients"*. AIDS. 2010 vol. 24(5): 777-9.
11. Seclén E, González MM, Corral A, De Mendoza C, Soriano V, Poveda E. *"High Prevalence of Natural Polymorphisms in Gag (CA-SP1) Associated with Reduced Response to Bevirimat, an HIV-1 Maturation Inhibitor"*. AIDS. 2010 vol. 24(3): 467-9.
12. Poveda E, Seclén E, González MM, García F, Chueca N, Aguilera A, Rodríguez JJ, González-Lahoz J, Soriano V. *"Design and Validation of New Genotypic Tools for Easy and Reliable Estimation of HIV Tropism before using CCR5 Antagonists"*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009 vol. 63 (5): 1006-10.

ANEXO II. Copia de las publicaciones relacionadas con esta tesis

High sensitivity of specific genotypic tools for detection of X4 variants in antiretroviral-experienced patients suitable to be treated with CCR5 antagonists

Eduardo Seclén, Carolina Garrido, María del Mar González, Juan González-Lahoz, Carmen de Mendoza, Vincent Soriano and Eva Poveda*

Infectious Diseases Department, Hospital Carlos III, Madrid, Spain

*Corresponding author. Laboratory of Molecular Biology, Department of Infectious Diseases, Hospital Carlos III, Sinesio Delgado 10, 28029 Madrid, Spain. Tel: +34-91-4532650; Fax: +34-91-7336614; E-mail: evapoveda@hotmail.com

Received 3 December 2009; returned 15 February 2010; revised 4 March 2010; accepted 28 March 2010

Objectives: Evaluation of the reliability of several V3-based genotypic predictors to infer viral tropism in patients infected with B and non-B strains of HIV-1.

Methods: Several genotypic tropism predictors were evaluated in plasma (RNA) samples from 198 HIV-1-infected patients, taking as gold standard the results of the phenotypic recombinant virus assay Phenoscript®. In addition, for 37 B subtype HIV-1 patients the phenotypic results from plasma samples were also compared with tropism predictions based on V3 amplification from paired peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Results: A total of 150 paired genotypic/phenotypic results were obtained from plasma specimens. Concordance values ranged from 63% to 85%, depending on the genotypic algorithm used. The best predictors in terms of sensitivity/specificity to detect X4 variants were WebPSSM_{X4/R5} (77%/87%), Geno2pheno_{FPR = 5%} (80%/77%) and an algorithm combining the '11/25' and 'Net charge' rules, termed Garrido's rule (80%/79%). The performance of genotypic predictors was better testing B than non-B clades. The overall sensitivity ranged from 28% to 94%, reaching 100% in subtype B antiretroviral-experienced patients using WebPSSM_{SI/NSI}, Geno2pheno_{FPR ≥ 5%} and Garrido's rule. Conversely, the sensitivity when testing non-B subtypes was poorer, ranging from 17% to 67%. Interestingly, the correlation between genotypic and phenotypic results was better when testing PBMCs than plasma using all genotypic predictors.

Conclusions: Genotypic tools based on V3 sequences may provide reliable information on HIV-1 tropism when testing clade B viruses, especially in antiretroviral-experienced patients. The sensitivity to detect X4 variants using genotypic tools may improve by testing proviral DNA instead of plasma RNA.

Keywords: tropism, co-receptor, genotypic predictors, CCR5 antagonists

Introduction

New classes of antiretroviral (ARV) drugs targeting different steps of the HIV replication cycle have recently been approved. Viral entry is an attractive target in the search for new drugs for HIV infection therapy. The fusion inhibitor, enfuvirtide, and the CCR5 antagonist, maraviroc, are so far the only entry inhibitors approved for clinical use. Many other compounds within this family are being currently investigated, such as the CCR5 antagonist vicriviroc, which is undergoing late phases of its clinical development.¹

CCR5 and CXCR4 are the major chemokine co-receptors used by HIV to enter into human cells.² According to the ability of the virus to use the CCR5 or the CXCR4 co-receptors, HIV isolates are

classified as R5-tropic, X4-tropic or dual/mixed tropic. Maraviroc represents the first CCR5 antagonist and the only oral HIV entry inhibitor approved for clinical use. Maraviroc exclusively inhibits the replication of R5-tropic HIV variants by an allosteric mechanism after its binding to the CCR5 co-receptor.³ Since maraviroc activity has only been demonstrated in patients harbouring exclusively R5-tropic variants, viral tropism determination is strongly recommended before maraviroc prescription.

Several phenotypic assays have been developed to determine HIV tropism in clinical samples, especially since the beginning of clinical studies with CCR5 antagonists. The Trofile® assay (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA, USA), which uses a recombinant virus assay,⁴ has been the most widely used to provide tropism information to date. However, the

Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists

Eva Poveda^{1*}, Eduardo Seclén¹, María del Mar González¹, Federico García², Natalia Chueca², Antonio Aguilera³, Jose Javier Rodríguez³, Juan González-Lahoz¹ and Vincent Soriano¹

¹Department of Infectious Diseases, Hospital Carlos III, Madrid, Spain; ²Department of Microbiology, Hospital San Cecilio, Granada, Spain; ³Department of Microbiology, Hospital CHUS-Conxo, Santiago de Compostela, Spain

Received 24 November 2008; returned 17 January 2009; revised 21 January 2009; accepted 30 January 2009

Background: Genotypic tools may allow easier and less expensive estimation of HIV tropism before prescription of CCR5 antagonists compared with the *Trofile*[®] assay (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA, USA).

Methods: Paired genotypic and *Trofile*[®] results were compared in plasma samples derived from the maraviroc expanded access programme (EAP) in Europe. A new genotypic approach was built to improve the sensitivity to detect X4 variants based on an optimization of the webPSSM algorithm. Then, the new tool was validated in specimens from patients included in the ALLEGRO trial, a multi-centre study conducted in Spain to assess the prevalence of R5 variants in treatment-experienced HIV patients.

Results: A total of 266 specimens from the maraviroc EAP were tested. Overall geno/pheno concordance was above 72%. A high specificity was generally seen for the detection of X4 variants using genotypic tools (ranging from 58% to 95%), while sensitivity was low (ranging from 31% to 76%). The PSSM score was then optimized to enhance the sensitivity to detect X4 variants changing the original threshold for R5 categorization. The new PSSM algorithms, PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINIS-6.4}, considered as X4 all V3 scoring values above –8 or –6.4, respectively, increasing the sensitivity to detect X4 variants up to 80%. The new algorithms were then validated in 148 specimens derived from patients included in the ALLEGRO trial. The sensitivity/specificity to detect X4 variants was 93%/69% for PSSM_{X4R5-8} and 93%/70% for PSSM_{SINIS-6.4}.

Conclusions: PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINIS-6.4} may confidently assist therapeutic decisions for using CCR5 antagonists in HIV patients, providing an easier and rapid estimation of tropism in clinical samples.

Keywords: maraviroc, tropism, *Trofile*, genotypic algorithm, PSSM

Introduction

HIV co-receptor antagonists have recently entered the therapeutic armamentarium against HIV infection¹ and represent the second class of entry inhibitors, along with enfuvirtide,² a fusion inhibitor, to gain regulatory approval. In the second step of the HIV entry process, the CD4–gp120 complex interacts with a chemokine co-receptor exposed on the cell surface, typically CCR5 or CXCR4.³ Accordingly, HIV isolates are classified as R5-tropic, X4-tropic or as dual/mixed-tropic, depending

on their co-receptor use.⁴ The term dual/mixed refers to viral isolates that may contain truly dual tropic viruses, which may use any chemokine co-receptor, or mixtures of virus isolates exclusively using either CCR5 or CXCR4, giving the whole virus population a dual tropic character.

Maraviroc represents the first CCR5 antagonist and the only oral HIV entry inhibitor approved for clinical use.¹ Several other compounds designed to block the gp120–CCR5 interaction are in advanced stages of clinical development (e.g. vicriviroc) or still in pre-clinical or early clinical stages.⁵ Maraviroc exclusively inhibits

*Corresponding author. Tel: +34-91-4532500; Fax: +34-91-7336614; E-mail: evapoveda@hotmail.com

the replication of R5-tropic HIV variants by an allosteric mechanism after binding to the transmembrane CCR5 co-receptor cavity.^{6,7} The presence of detectable dual-tropic X4 viruses or mixtures that contain CXCR4-using variants along with R5 viruses has been associated with therapeutic failure using maraviroc.^{8,9} Since the activity of CCR5 antagonists is limited to patients in whom only R5-tropic viruses can be detected, viral tropism determination is required before maraviroc prescription. Several assays have been developed to determine HIV tropism in clinical samples.¹⁰ The *Trofile*[®] assay (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA, USA), which uses a recombinant virus assay,¹¹ has been the most widely used to date to provide tropism information. Although phenotypic assays such as *Trofile*[®] are considered to be very reliable, they are expensive and require special facilities and expertise. HIV-1 co-receptor usage can, alternatively, be predicted using the amino acid sequence of the V3 region of gp120, which is the main determinant of viral tropism.^{12,13} Indeed, several genotypic algorithms have been developed to predict HIV co-receptor usage based on V3 genetic sequences, and many of them are available at publicly accessible web sites.¹⁰

Following the approval of maraviroc, the interest in knowing the accuracy of, and concordance between, genotypic and phenotypic assays in determining HIV tropism in clinical samples has been on the rise. Although early comparisons noticed relatively poor concordances, mainly due to low sensitivity to detect X4 variants using genotypic algorithms (<45%),¹⁴ more recent studies have shown a better sensitivity for the detection of X4 variants using certain genotypic tools.^{15–18}

The prediction of HIV co-receptor usage applying genotypic approaches needs further research, improvements and preferably clinical validation before being used in the clinic. Here, we report the results of a comparative study of HIV tropism using the *Trofile*[®] assay and several genotypic tools in samples derived from antiretroviral-experienced patients included in the maraviroc expanded access programme (EAP) in Europe. Following optimization of the webPSSM algorithm, further validation was carried out on a different set of samples.

Materials and methods

Study population

A total of 266 plasma specimens were collected from HIV-infected individuals enrolled in the maraviroc EAP in Europe. Inclusion criteria required age older than 16 years, virological failure under antiretroviral therapy, plasma HIV-RNA >1000 copies/mL and resistance mutations to drugs belonging to two or more antiretroviral families. All specimens were tested for HIV tropism using the *Trofile*[®] assay (Monogram Biosciences). Duplicates of these samples were sent to the Molecular Biology Laboratory at Hospital Carlos III in Madrid, Spain, where V3 sequences were obtained and distinct genotypic tools to estimate viral tropism were examined.

A separate set of 148 plasma samples collected from HIV-1-infected patients included in the ALLEGRO trial were then tested using a modification of the PSSM score to estimate HIV tropism. The ALLEGRO trial was a multicentre study conducted in Spain during 2007, which assessed the prevalence of R5 variants in HIV-1-infected antiretroviral-experienced patients in Spain. To be included in the trial, HIV-1 patients had to harbour plasma HIV-RNA above 1000 copies/mL under any antiretroviral regimen. Plasma specimens were sent to Monogram Biosciences to test viral

tropism using the *Trofile*[®] assay. Stored samples were tested in parallel using V3 genotypic tools.

Determination of HIV co-receptor usage based on V3 sequences

The *env* V3 region was amplified and sequenced from plasma HIV-RNA as described previously.¹⁵ Sequence analyses were performed using Seqscape v2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Nucleotide mixtures were considered when the second highest peak in the electropherogram was above 25%. V3 sequences harbouring nucleotide mixtures were translated into all possible amino acid permutations.¹⁴ Sequences with eight or more nucleotide mixtures within the V3 region were excluded from subsequent analyses, given the enormous diversity (>512) of possible amino acid sequences generated. HIV-1 subtyping was performed by phylogenetic analyses.

In samples belonging to the European maraviroc EAP, co-receptor usage was estimated for each V3 sequence using several bioinformatics tools freely available at three web sites: *Wetcat*,¹⁹ which uses C4.5, C4.5p8-p12, PART, SVM and charge rule; *webPSSM*,²⁰ which uses both X4R5 and SINSI matrixes; and *geno2pheno_{coreceptor}*,²¹ which uses 1%, 5%, 10%, 15% and 20% of false-positive rates (FPRs) for the detection of X4 variants. Co-receptor usage was also estimated using other simple rules such as 11/25,²² 11/24/25²³ and *net charge*.²⁴ All HIV-1 variants were classified as R5- or X4-tropic. For samples containing nucleotide mixtures, a sample was labelled as X4 if any permutation of the V3 sequence was identified as X4.

PSSM is a simple bioinformatic method that estimates the propensity of V3 amino acid sequences to use CXCR4. The PSSM is a matrix of numbers whose columns represent amino acid positions in the V3 loop and whose rows represent the possible residues. A sequence is given a score by summing the cells in the matrix that correspond to the particular residue present in the sequence at each V3 position. The X4 and R5 threshold values originally established were –2.88 and –6.96, respectively. Accordingly, V3 sequences with values below the R5 threshold (–6.96) will be considered as being R5, while sequences with values above –2.88 will be considered as predictive of X4. Intermediate scores are recommended to be interpreted using the 11/25 rule.²⁰ Since PSSM provides a report with a single score for each V3 sequence, it is possible to increase the sensitivity to detect X4 variants modifying the threshold originally established to classify a sample as R5 or X4. Given that all samples had been tested using the *Trofile*[®] assay, those results were taken as reference for optimizing PSSM.

Statistical analyses

Descriptive results are expressed as median values and interquartile ranges (IQRs). Comparisons were performed using the Student's *t*-test for continuous variables, and the Pearson, χ^2 or Fisher's exact tests for categorical variables. Receiver operating curves (ROCs) were performed for assessing the accuracy/concordance between distinct PSSM thresholds and *Trofile* results. The best PSSM discriminatory thresholds for X4R5 and SINSI matrixes increasing the sensitivity to detect X4-variants were identified. For samples with V3 sequences containing nucleotide mixtures, the highest PSSM score obtained in the different V3 sequences generated was considered for prediction of co-receptor usage. All statistical analyses were made using the SPSS software package v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Concordance between V3 genotypic tools and Trofile®

A total of 266 specimens from the maraviroc EAP in Europe were tested. Paired genotypic/phenotypic results could be obtained in 202 (76%). Failure to produce genotypic results occurred in 20 (7.5%) specimens, due to the presence of more than 8 nucleotide mixtures in 12 (4.5%) or repeated problems in the amplification and/or sequencing process in 8 (3%). Phenotypic results could not be produced in 46 samples (17.3%). In samples with both genotypic and phenotypic results, concordance ranged from 64% using geno2pheno 20%-FPR to 80% using PSSM_{X4R5} (Table 1).

The sensitivity and specificity for the detection of X4 variants using genotypic-based algorithms compared with Trofile® are depicted in Figure 1. The sensitivity was generally low, ranging from 31% for geno2pheno 1%-FPR to 76% using geno2pheno 20%-FPR. In contrast, the specificity was generally high, ranging from 58% for geno2pheno 20%-FPR to 95% using geno2pheno 1%-FPR or C4.5 and C4.5p8p12.

Table 1. Concordance between Trofile® and genotypic results in clinical specimens belonging to the maraviroc EAP in Europe

Genotypic algorithms	Concordance with Trofile® (%)
11/25	75
11/24/25	75
C4.5	76
C4.5p8p12	75
PART	75
SVM	68
Charge rule	74
PSSM _{X4R5}	80
PSSM _{SINIS}	79
Geno2pheno 1%	75
Geno2pheno 5%	76
Geno2pheno 10%	71
Geno2pheno 15%	67
Geno2pheno 20%	66

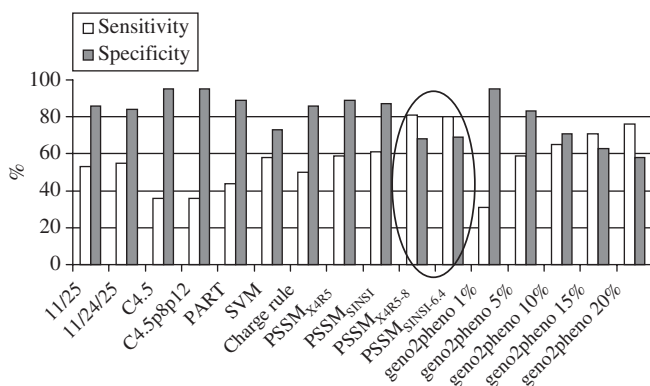


Figure 1. Sensitivity and specificity for detecting X4 variants using V3 genotypic-based algorithms and the new proposed PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINIS-6.4} (highlighted within an oval).

The discordant results between genotypic methods and Trofile® could not be attributed to genetic subtype diversity due to the low prevalence of non-B subtypes in the study population (<1%). All but two specimens belonged to clade B carriers; these two samples were from subtypes F and D, respectively. For the subtype F specimen, all genotypic interpretation systems were in agreement with Trofile® results (R5-tropic). In contrast, discordant results between Trofile® and genotypic tools were noticed testing the clade D specimen.

Improvement of the PSSM score to detect X4 viruses

The sensitivity/specificity to detect X4 variants using PSSM_{X4R5} was 59%/89%, and 61%/87% using PSSM_{SINIS} (Figure 1). The accuracy between them and Trofile® was assessed using ROC analyses. The areas under the ROC values were 0.81 (95% confidence interval: 0.74–0.87) and 0.80 (95% confidence interval: 0.73–0.86) for PSSM_{X4R5} and PSSM_{SINIS}, respectively. In order to enhance the sensitivity to detect X4 variants, the PSSM score was optimized using ROC analyses to categorize samples as X4. For PSSM_{X4R5}, the best PSSM threshold was –8, increasing the sensitivity to detect X4 variants to 81% with a specificity of 68%. For PSSM_{SINIS}, the best PSSM threshold was –6.4, increasing the sensitivity to detect X4 variants to 80% with a specificity of 69%. The PSSM algorithms using the new PSSM thresholds were re-named as PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINIS-6.4}. Accordingly, samples were considered as X4 when the PSSM_{X4R5} matrix gave values above –8, and were otherwise interpreted as R5. Likewise, samples were interpreted as X4 when the PSSM_{SINIS} matrix gave values above –6.4.

Validation of PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINIS-6.4}

The new PSSM thresholds for estimating HIV-1 co-receptor usage were tested in a separate set of 148 plasma specimens belonging to HIV-1-infected patients included in the ALLEGRO trial. These subjects had a median plasma HIV-RNA of 4.2log copies/mL (IQR: 4.04–4.66), and their median CD4 count was 269 cells/mm³ (IQR: 148–362). Co-receptor usage for each V3 sequence was estimated using both PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINIS-6.4}. Paired genotypic/phenotypic results could be obtained in 118 (80%) of the samples. Genotypic results could not be produced for three samples (2.0%) due to failures during amplification and/or sequencing processes. On the other hand, Trofile® did not produce results in 21 specimens (14.2%). The concordance between Trofile® and PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINIS-6.4} was 75% and 76%, respectively. The sensitivity/specificity to detect X4 variants using PSSM_{X4R5-8} was 93%/69%, 97% being the negative predictive value (NPV) and 49% the positive predictive value (PPV). For PSSM_{SINIS-6.4}, the sensitivity/specificity to detect X4 variants was 93%/71%, with 97% NPV and 51% PPV (Figure 1).

Estimated rate of R5 and X4 variants using genotypic tools or Trofile®

The rate of X4 variants in samples from the maraviroc EAP in Europe was 31.7% using Trofile®. In this population, an overestimation of X4 variants was seen using both PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINIS-6.4}, which gave rates of 48% and 47%, respectively. Similarly, an overestimation of X4 variants was seen in the set

Reliable genotypic algorithms to predict HIV tropism

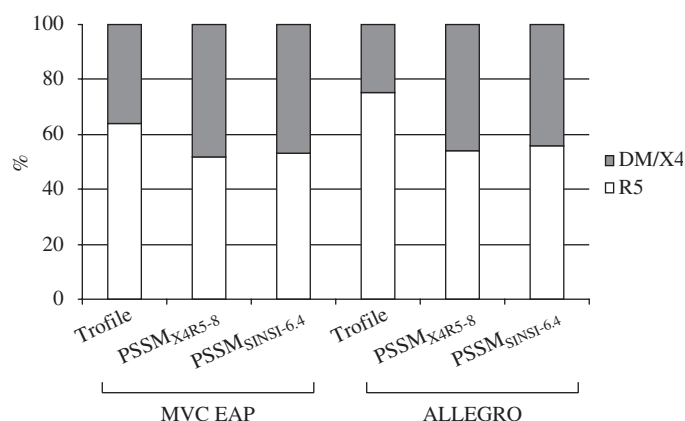


Figure 2. Prevalence of R5- and DM/X4-tropic HIV-1 variants using *Trofile*® versus PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINSI-6.4} in clinical samples collected during the maraviroc EAP (MVC EAP) in Europe and in the ALLEGRO trial.

of 148 samples belonging to the ALLEGRO trial. The estimated rate of X4 variants was 25% using *Trofile*® and increased to 46% and 44% using PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINSI-6.4}, respectively (Figure 2).

It is noteworthy that non-reportable results using genotypic tools occurred less frequently than *Trofile*® (7.5% versus 17.2%, respectively). In the set of samples from the maraviroc EAP in Europe in which *Trofile* failed to report results ($n=44$), PSSM_{X4R5-8} results in 48% of them ($n=21$) as R5.

Discussion

The use of genotypic tools may be an easier, faster and a less expensive alternative approach to assess HIV-1 tropism compared with using the *Trofile*® assay, which is currently considered the gold standard.¹⁰ However, the reliability of genotypic methods has been under debate, with generally poor performance observed in particular when testing samples derived from antiretroviral-experienced patients, who are otherwise currently the most frequent candidates for maraviroc therapy.

The results of our study testing a set of 202 clinical specimens from patients enrolled in the maraviroc EAP in Europe showed that the sensitivity to detect X4 variants using different currently available genotypic algorithms is generally low, ranging from 31% to 76%, taking *Trofile*® as reference, which is in agreement with previous reports.^{14,25–27} This low sensitivity was noticed even considering as X4 those samples containing any nucleotide mixtures in the V3 sequences that lead to a single permutation interpreted as X4. In order to enhance the sensitivity to detect X4 variants, we introduced a simple modification in the webPSSM algorithm, shifting the threshold established for considering the V3 sequences as R5, based on ROC analyses. The new PSSM algorithms named as PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINSI-6.4} categorized samples as X4 when V3 scores were above -8 or -6.4 , respectively. These new approaches increased the sensitivity to detect X4 variants to above 80%.

The reliability of the new PSSM approaches was then validated in a separate set of 148 samples collected from patients enrolled in the ALLEGRO trial. In this dataset, the sensitivity/

specificity for detecting X4 variants using PSSM_{X4R5-8} was 93%/69%, with 97% being the NPV and 49% the PPV. For PSSM_{SINSI-6.4}, the sensitivity/specificity to detect X4 variants was quite similar, 93%/70%, with 97% being the NPV and 51% the PPV. Thus, 97% of clinical samples classified as R5 by genotypic tools were also considered as R5 phenotypically, and only 3% were misclassified. Thus, the possibility of prescribing maraviroc in patients with *Trofile*® reported X4 variants based on a false-negative prediction by the new PSSM scores was low.

Along with the improved sensitivity to detect X4 variants, the PPV diminished to ~50%. This means that using PSSM_{X4R5-8} and/or PSSM_{SINSI-6.4}, half of the samples reported as X4 could be R5 by *Trofile*®. However, this low specificity for X4 variants would most likely be lower using the new enhanced version of *Trofile*®, which is 10- to 100-fold more sensitive for X4 minor populations.²⁸ On the other hand, it is noteworthy that *Trofile*® consistently considers as non-reportable more than 15% of tested samples, while failure to produce results is seen in <7.5% of cases using genotypic tools.^{29,30} Altogether, the proportion of HIV patients to whom maraviroc could wrongly be denied based on the overestimation of X4 variants using V3 genotypic tools could compensate for the lack of reportable R5 specimens using *Trofile*®. Moreover, samples considered initially as X4 using PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINSI-6.4} could be confirmed using *Trofile*® to minimize overestimation of X4 variants. In this way, genotypic tools could be used for rapid screening, allowing maraviroc prescription when reporting R5 variants, requiring further *Trofile*® testing only for those samples interpreted as X4.

In summary, our results highlight the feasibility of employing the genotypic algorithms PSSM_{X4R5-8} and PSSM_{SINSI-6.4} to assist in therapeutic decisions on the use of CCR5 antagonists in HIV patients in routine clinical practice, providing an easier and more rapid determination of viral tropism. The new PSSM algorithms could be performed in laboratories familiar with virus sequencing with no other specific technological requirements, avoiding the overseas shipment of plasma specimens.

Acknowledgements

We would like to thank Mark Jensen for critical reading of the manuscript.

Funding

This work was funded in part by grants from Fundación Investigación y Educación en SIDA (IES), Pfizer SA, Madrid, Spain, the European NEAT project, Red de Investigación en SIDA (RIS, ISCIII-RETIC-RD06), Agencia Lain Entralgo, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (CTS213; PO6-CTS-01498), Consejería de Salud (PI-0129; 377/05) and Fondo de Investigación Sanitaria (PI051513, PI 07/0207, CP06/284).

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Anon. FDA approves maraviroc tablets. *AIDS Patient Care STDs* 2007; **21**: 702.
2. Roberston D. US FDA approves new class of HIV therapeutics. *Nat Biotechnol* 2003; **21**: 470–1.
3. Briz V, Poveda E, Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 619–27.
4. Berger E, Doms R, Fenyo E *et al.* A new classification for HIV-1. *Nature* 1998; **391**: 240.
5. Esté J, Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet* 2007; **370**: 81–8.
6. Dorr P, Westby M, Dobbs S *et al.* Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-HIV type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4721–32.
7. Castonguay L, Weng Y, Adolfsen W *et al.* Binding of 2-aryl-4(piperidin-1-yl)butanamines and 1,3,4-trisubstituted pyrrolidines to human CCR5: a molecular modeling-guided mutagenesis study of the binding pocket. *Biochemistry* 2003; **42**: 1544–50.
8. Gulick R, Lalezari J, Goodrich J *et al.* Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008; **359**: 1429–41.
9. Fatkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A *et al.* Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008; **359**: 1442–55.
10. Poveda E, Briz V, Quinones-Mateu M *et al.* HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *AIDS* 2006; **20**: 1359–67.
11. Whitcomb J, Huang W, Fransen S *et al.* Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine HIV type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 566–75.
12. Chan S, Speck R, Power C *et al.* V3 recombinants indicate a central role for CCR5 as coreceptor in tissue infection by HIV type 1. *J Virol* 1999; **73**: 2350–8.
13. Jensen M, Van't Wout A. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev* 2003; **19**: 145–9.
14. Low A, Dong W, Chan D *et al.* Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS* 2007; **21**: F17–24.
15. Poveda E, Briz V, Roulet V *et al.* Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatics tools for determining HIV coreceptor use. *AIDS* 2007; **21**: 1487–90.
16. Raymond S, Delobel P, Mavigner M *et al.* Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* 2008; **22**: F11–7.
17. Garrido C, Roulet V, Chueca N *et al.* Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different HIV-1 subtypes. *J Clin Microbiol* 2008; **61**: 694–8.
18. de Mendoza C, Van Baelen K, Poveda E *et al.* Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; **48**: 241–4.
19. Pillai S, Good B, Richman D *et al.* A new perspective on V3 phenotype prediction. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; **19**: 145–9.
20. Jensen M, Li F, van't Wout A *et al.* Improved co-receptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of HIV type 1 *env* V3 loop sequences. *J Virol* 2003; **77**: 13376–88.
21. Sing T, Beerenwink N, Lengaver T. Learning mixtures of localized rules by maximizing the area under the ROC curve. In: *Proceedings of the First International Workshop on ROC Analysis in Artificial Intelligence, Valencia, Spain, 2004*. pp. 89–96. Association for Computing Machinery, New York, NY, USA.
22. De Jong J, De Ronde A, Keulen W *et al.* Minimal requirements for the HIV type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 1992; **76**: 3852–64.
23. Cardozo T, Kimura T, Philpott S *et al.* Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; **23**: 415–26.
24. Fouchier R, Groenink M, Kootstra N *et al.* Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the HIV type 1 gp120 molecule. *J Virol* 1992; **66**: 3183–7.
25. Recordon-Pinson P, Soulié C, Anies G *et al.* Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor tropism in a clinical setting. *Antivir Ther* 2008; **13** Suppl 3: A113.
26. Obermeier M, Sichtig N, Braun P *et al.* Determination of HIV-1 coreceptor usage in German patients—comparison of genotypic methods with the Trofile phenotypic assays. *Antivir Ther* 2008; **13** Suppl 3: A112.
27. Soulié C, Derache A, Aimé C *et al.* Comparison of two genotypic algorithms to determine HIV-1 tropism. *HIV Med* 2008; **9**: 1–5.
28. Trinh L, Han D, Huang W *et al.* Technical validation of an enhanced sensitivity Trofile HIV coreceptor tropism assay for selecting patients for therapy with entry inhibitors targeting CCR5. *Antivir Ther* 2008; **13** Suppl 3: A128.
29. Chueca N, Martin L, Alvarez M *et al.* A combination of bioinformatics tools can be accurately used for the screening of coreceptor usage in clinical samples. *Antivir Ther* 2008; **13** Suppl 3: A106.
30. Poveda E, Seclén E, Gonzalez M *et al.* Improvement of genotypic algorithms to predict HIV-1 tropism in treatment-experienced patients: correlation with Trofile results. *Antivir Ther* 2008; **13** Suppl 3: A109.

Dynamics of HIV tropism under suppressive antiretroviral therapy: implications for tropism testing in subjects with undetectable viraemia

Eduardo Seclén, María del Mar González, Carmen De Mendoza, Vincent Soriano and Eva Poveda*

Laboratory of Molecular Biology, Infectious Diseases Department, Hospital Carlos III, Madrid, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-91-4532650; Fax: +34-91-7336614; E-mail: evapoveda@hotmail.com

Received 8 January 2010; returned 16 February 2010; revised 10 April 2010; accepted 16 April 2010

Objectives: The use of maraviroc as part of a simplification of antiretroviral therapy (ART) is hampered by the difficulty of assessing viral tropism in patients with undetectable viraemia. In this context, information on tropism might be obtained from testing either older stored viraemic sera collected before initiation of ART or current proviral DNA in peripheral blood cells.

Methods: HIV-1-infected individuals who had initiated ART and had undetectable viraemia for >2 years were identified. V3 genotyping was performed in parallel from plasma HIV-RNA and proviral DNA before starting ART and from proviral DNA while on suppressive ART. Viral tropism was interpreted using geno2pheno (false positive rate = 10%) and an optimized version of position specific scoring matrices (PSSM) with a greater sensitivity to detect X4 variants (PSSM_{X4/R5-8}).

Results: A total of 78 HIV-1 infected individuals were examined. Mean time under suppressive ART was 3.5 years (interquartile range: 2.3–4.4). The rate of X4 variants in plasma and proviral DNA samples at baseline was 32.8% and 34.0%, respectively. It was 33.9% after >2 years of suppressive ART in DNA samples. Paired RNA/DNA tropism results at baseline could be obtained for 38 patients, with an overall 82% concordance. After >2 years of suppressed plasma viraemia, HIV tropism was re-assessed in proviral DNA; tropism switches were uncommon, especially comparing baseline and most recent DNA longitudinal specimens (12%).

Conclusions: HIV tropism switches over time under suppressive ART are rare. There is a relatively good correlation between RNA and DNA tropism estimations using genotypic tests. Thus, HIV-1 tropism might confidently be examined either in older stored viraemic plasma specimens or in current proviral DNA samples.

Keywords: HIV-1 tropism, genotypic tests, maraviroc, simplification, intensification

Introduction

CCR5 and CXCR4 are the major cellular co-receptors involved in the entry of HIV-1 into the host cell. Based on the ability of the virus to use one or the other co-receptor, HIV-1 variants are classified as R5-tropic, X4-tropic or dual tropic. The development and approval of maraviroc, the first CCR5 antagonist to be used in the clinical setting, which exclusively acts against R5 variants,¹ has prompted the design of tools for rapid and easy determination of HIV co-receptor usage. The phenotypic assay Trofile[®] (Monogram BioSciences, San Francisco, CA, USA) has been the most widely used; however, it displays logistical and technical limitations that represent a serious obstacle for the widespread use of CCR5 antagonists in clinical settings, especially outside the United States, where the diagnostic company marketing the phenotypic test is located.

Over the last few years, several approaches based on V3 genotyping have been developed to predict HIV co-receptor usage. It is encouraging that clinical response to maraviroc has recently been reported to be similar comparing genotypic tools and the reference phenotypic Trofile[®] assay.² Since genotypic methods may allow more rapid, easier and cheaper assessment of HIV tropism than phenotypic testing, it is expected that their use will take over and replace phenotypic tropism testing in most clinical settings, as has occurred with antiretroviral drug resistance testing.

Two special features of maraviroc may allow consideration of its use as part of simplification or intensification antiretroviral strategies. First, maraviroc displays a good safety profile, especially regarding metabolic parameters such as lipids and glucose.³ Second, CD4 gains in the face of virological failure may occur more frequently using maraviroc than other